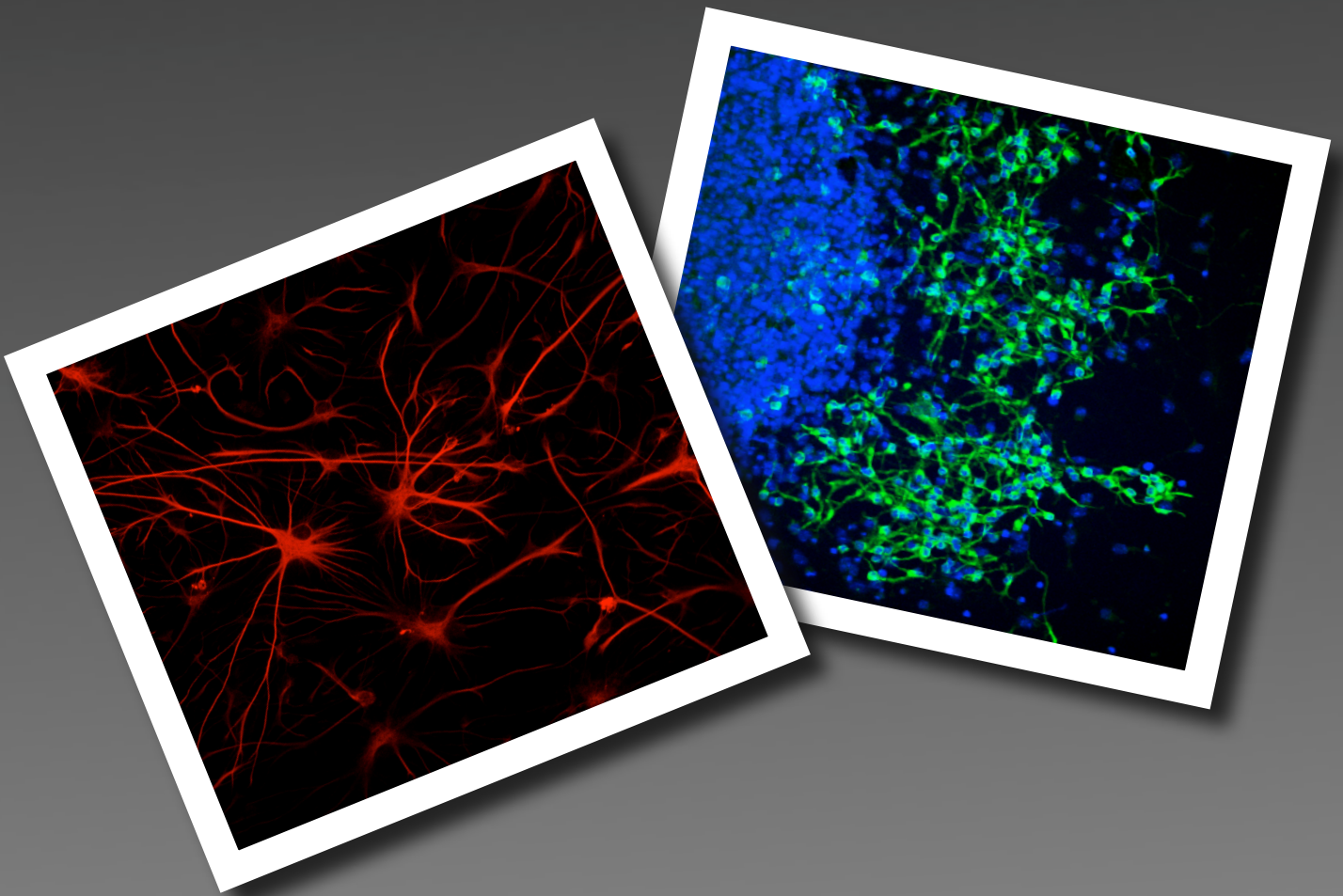


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Bioquímica

**BASES MOLECULARES DE LA
DIFERENCIACIÓN DE ASTROCITOS Y
NEURONAS DURANTE EL DESARROLLO DEL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. IMPLICACIÓN
DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN
DREAM Y DLX4**



Antonio Fernández Pérez

Madrid, 2008

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**BASES MOLECULARES DE LA
DIFERENCIACIÓN DE ASTROCITOS Y
NEURONAS DURANTE EL DESARROLLO DEL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. IMPLICACIÓN
DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN
DREAM Y DLX4**

Antonio Fernández Pérez

Licenciado en Biología
Licenciado en Bioquímica

Director:
Dr. Mario Vallejo Fernández de la Reguera

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid “Alberto Sols”
Consejo Superior de Investigaciones Científicas/UAM
2008



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
"ALBERTO SOLS"

D. Mario Vallejo Fernández de la Reguera, Doctor en Medicina y Cirugía e Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas adscrito al Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" de Madrid,

CERTIFICA:

Que D. Antonio Fernández Pérez, Licenciado en Ciencias Biológicas y en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado:

"Bases moleculares de la diferenciación de astrocitos y neuronas durante el desarrollo del sistema nervioso central. Implicación de los factores de transcripción DREAM y Dlx4"

El que suscribe considera el trabajo realizado satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, expide el presente certificado en Madrid a 3 de septiembre de 2008.

Fdo.: Mario Vallejo Fernández de la Reguera
Profesor Honorario de la Universidad Autónoma de Madrid.

*A mis padres, Antonio y Tina; a mis hermanos, Laura y Sergio;
al resto de mi familia, en especial, a mi abuelo Amalio,
que no pudo ver acabada esta tesis doctoral.*

Para mi insustituible Alicia.

*"Cuando abandones tus sueños, sabrás que has muerto."
HdS*

*"Creo que he visto una luz al otro lado del río.
Sobre todo, creo que no todo está perdido.*

*...
Oigo una voz que me llama, casi un suspiro...*

*Rema, rema, rema...
Rema, rema, rema..."*

Jorge Drexler

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral se ha realizado gracias al disfrute de una beca predoctoral asociada al proyecto “Mecanismos moleculares de la diferenciación de astrocitos corticales y del cierre del tubo neural dependientes de la expresión génica regulada por factores de transcripción de tipo homeodominio” (referencia BMC2002-00870) concedido al Dr. Mario Vallejo Fernández de la Reguera por el Ministerio de Educación y Ciencia.

Del mismo modo, mi participación en el proyecto “Mecanismos transcripcionales de regulación del cierre del tubo neural durante el desarrollo embrionario” (referencia BFU2005-02052) concedido al Dr. Mario Vallejo Fernández de la Reguera y financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia ha permitido la conclusión y el enriquecimiento de la presente tesis doctoral.

Me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Mario Vallejo por la confianza depositada en mí para el desarrollo de los proyectos de investigación en los que he participado, y cuyos resultados quedan plasmados en la presente tesis doctoral y las publicaciones relacionadas. Su experiencia, sus consejos y su incansable dedicación como director de esta tesis han facilitado enormemente la consecución de la misma.

De manera muy especial, me gustaría agradecer a la Dra. Mercedes Mirasierra su incondicional e invaluable apoyo, su ayuda y su cariño durante todo este tiempo; su persona ha sido indispensable para afrontar todas las dificultades experimentales y personales a lo largo de todo este periodo. Gracias por ser, gracias por estar.

Por supuesto, agradecer la inestimable ayuda prestada y los momentos compartidos con las doctoras Beatriz Cebolla, Isabel Lastres y Sita Lakhwani durante gran parte del tiempo que ha llevado completar esta tesis. Tampoco me olvido del Dr. Francisco Garrido, del Dr. Gabino Sanchez, Edel Reytor y Patricia García, a los cuales agradezco su fantástica amistad, su apreciable apoyo, su interés y su ayuda a lo largo de todos estos años.

Antonio Fernández Pérez

Resumen

RESUMEN

Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso central (SNC) las neuronas y las células gliales se generan secuencialmente a partir de una población de células progenitoras comunes. La actividad coordinada de los factores de transcripción juega un papel fundamental a la hora de regular la neurogénesis y la gliogénesis, así como el proceso de transición entre ambos. En esta tesis se estudia, por un lado, el papel del factor de transcripción DREAM en los procesos de diferenciación astrogliar y en la sincronización de la transición entre la neurogénesis y la astrogliogénesis; y por otro lado, la posible participación de la homeoproteína *Dlx4* en los mecanismos transcripcionales que regulan la expresión de GFAP y su papel durante el proceso de diferenciación neuronal.

Nuestros resultados demuestran que DREAM es esencial para el proceso de diferenciación de astrocitos inducido por el neuropéptido PACAP. Además, los estudios llevados a cabo en ratones genéticamente modificados que carecen de DREAM muestran que al inicio del periodo postnatal la astrogliogénesis se encuentra retrasada y existe un mayor número de neuronas. También hemos demostrado que en edades posteriores, los ratones carentes de DREAM presentan un mayor número de astrocitos, debido, probablemente, a la puesta en marcha de mecanismos compensatorios promovidos por el exceso de neuronas.

También se ha comprobado que en cultivos celulares de precursores corticales la expresión de *Dlx4* es dependiente de la presencia de bFGF. Contrariamente a nuestra hipótesis inicial, *Dlx4* no participa en la regulación de la expresión de *gfap*. En cambio, hemos puesto de manifiesto que, durante el periodo de neurogénesis, *Dlx4* se expresa en los precursores neurales presentes en la zona ventricular en el SNC embrionario y en las neuronas diferenciadas de la placa cortical y de las eminencias gangliónicas, pero no en las neuronas que están migrando, lo que induce a pensar que *Dlx4* participa en el proceso de diferenciación terminal de las neuronas. Así mismo, la localización intracelular de *Dlx4* parece estar relacionada con su expresión en células progenitoras o en neuronas.

En resumen, nuestros estudios proporcionan datos que apoyan un papel para DREAM y *Dlx4* en el proceso de desarrollo embrionario del SNC; el primero durante la diferenciación de astrocitos y la transición entre la neurogénesis y astrogénesis, y el segundo en el proceso de diferenciación neuronal.

Summary

SUMMARY

During embryonic development neurons and glial cells in the central nervous system (CNS) are generated sequentially from a population of common progenitor cells. The coordinated activity of transcription factors plays a fundamental role in the regulation of neurogenesis and gliogenesis, and of the transition from one to the other. In this thesis, we have investigated, on the one hand, the role of the transcription factor DREAM in astroglial differentiation and synchronization of the switch between neurogenesis and astrogliogenesis; and, on the other hand, the possible participation of the homeoprotein Dlx4 in the transcriptional mechanisms that regulate GFAP expression and in the regulation of neuronal differentiation.

We demonstrate that DREAM is essential for the differentiation of astrocytes induced by the neuropeptide PACAP. In addition, studies carried out in genetically modified DREAM-deficient mice show that, during the early postnatal period, the onset of astrogliogenesis is delayed and the number of neurons is increased. Also, we have observed that in later stages, *dream*^{-/-} mice show an increased number of astrocytes, probably due to the existence of compensatory mechanisms triggered by the excess of neurons.

Also, we verified that in cultured cortical precursor cells the expression of Dlx4 depends on the presence of bFGF. Contrary to our initial hypothesis, Dlx4 does not participate in the regulation of *gfap* expression. However, we have shown that, during the neurogenesis period, Dlx4 is expressed both in neural progenitor cells located in the ventricular zone of the embryonic CNS and in the differentiated neurons located in the cortical plate and the ganglionic eminences, but not in migrating neurons. This suggests that Dlx4 could participate in the process of terminal differentiation of neurons. Also, the intracellular location of Dlx4 seems to be related to its expression in progenitor cells or neurons.

In summary, our studies provide data that support different roles for DREAM and Dlx4 during CNS development; the first one setting the neurogenesis to astrogenesis switch during astroglial differentiation, and the second one in the neuronal differentiation process.

Índice

ABREVIATURAS	4
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Diferenciación celular en el SNC	5
1.2. Bases moleculares de la neurogénesis	7
1.2.1 Determinación mediante factores de transcripción	7
1.2.1.1 Genes proneurales de tipo bHLH	7
1.2.1.2 Factores de transcripción de tipo homeodominio	9
1.2.1.3 Factores de transcripción de la familia Dlx	9
1.2.1.3.1 Características generales	10
1.2.1.3.2 Funciones de los genes <i>distal-less</i> durante el desarrollo del SNC	11
1.2.1.3.3 Dlx4	12
1.2.2 Determinación mediante mecanismos de señalización	14
1.2.2.1 Neurotrofinas	14
1.2.2.2 Señalización por Wnt	15
1.3. Migración neuronal en el telencéfalo	16
1.4. Bases moleculares de la generación de astrocitos	19
1.4.1 Factores intrínsecos	19
1.4.1.1 Genes Sox	19
1.4.1.2 Factor nuclear I (NFI)	20
1.4.1.3 Mecanismos epigenéticos	20
1.4.2 Vías de señalización que inducen astrogénesis	21
1.4.2.1 Astrogénesis en respuesta a citoquinas neurotróficas	21
1.4.2.2 Notch	22
1.4.2.3 BMPs	23
1.4.2.4 PACAP y DREAM	24
2. OBJETIVOS	26

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales	27
3.2. Cultivos celulares	27
3.2.1. Células RC2.E10	28
3.2.1 Células RH1.C4	28
3.2.3 Cultivos celulares primarios	28
3.3. Generación y cultivo de neuroesferas	29
3.4. Obtención del ADN complementario de <i>Dlx4</i> de rata	30
3.5. Plásmidos	31
3.5.1 Vectores de expresión	31
3.5.2 Vectores reporteros	31
3.6. Ensayos de retardo del la movilidad electroforética (EMSA)	32
3.7. Western immunoblot	32
3.8. Inmunocitoquímica	33
3.9. Inmunohistoquímica	36
3.9.1 Inmunodetección de <i>Dlx4</i>	36
3.9.2 Inmunodetección de los marcadores astrocitarios GFAP y S100 β , y del marcador neuronal NeuN en ratones <i>dream</i> ^{+/+} y <i>dream</i> ^{-/-}	37
3.10. Análisis de imágenes	38
3.11. Transfecciones	39

4. RESULTADOS

4.1 Implicación de DREAM en la astrogénesis y en la sincronización de la transición entre neurogénesis y astrogénesis	40
4.1.1 DREAM es necesario para la expresión de GFAP inducida por PACAP en precursores corticales	40
4.1.2 DREAM participa en la regulación de la generación de astrocitos <i>in vivo</i>	43
4.1.3 La transición de neurogénesis a astrogénesis está alterada en ausencia de DREAM	46

4.2 Implicación de Dlx4 en la regulación de la diferenciación neural	52
4.2.1 Dlx4 se expresa en el sistema nervioso central en desarrollo	52
4.2.2 Dlx4 es capaz de unirse “ <i>in vitro</i> ” al promotor de GFAP	53
4.2.3 Dlx4 se expresa en cultivos primarios de células precursoras de la corteza cerebral de embriones de 17 días de gestación	55
4.2.4 La sobre expresión de Dlx4 en cultivos primarios tratados con CNTF no altera la activación del promotor de GFAP	57
4.2.5 Patrón de expresión de Dlx4 durante el desarrollo del telencéfalo	58
4.2.6 La diferenciación neuronal inducida por BDNF conlleva un aumento en la expresión de Dlx4	63
 5. DISCUSIÓN	
 5.1 Papel de DREAM en la diferenciación de astrocitos	65
5.2 Dlx4 no participa en la regulación del gen <i>gfap</i> .	69
5.3 Implicación de Dlx4 en la regulación de la diferenciación y regionalización neuronal.	70
 6. CONCLUSIONES	75
 7. BIBLIOGRAFÍA	76
 8. ANEXO I: Publicaciones directamente derivadas de la Tesis	
 9. ANEXO II: Publicaciones relacionadas con la Tesis	

Abreviaturas

ABREVIATURAS

BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*. Factor neurotrófico derivado del cerebro.

bFGF: *Basic fibroblast growth factor*. Factor de crecimiento de fibroblastos básico.

bHLH: *Basic helix-loop-helix*. Dominio básico hélice-lazo-hélice.

BLBP: *Brain lipid-binding protein*. Proteínas de unión a lípidos del cerebro.

BMPs: *Brain morphogenetic proteins*. Proteínas morfogenéticas del hueso.

BP-1: *Beta protein 1*. Proteína beta 1.

CNTF: *Ciliary neurotrophic factor*. Factor neurotrófico ciliar.

CT-1: Cardiotropina 1.

DRE: *Downstream regulatory element*. Elemento regulador distal.

DREAM: *DRE-antagonist modulator*. Modulador antagónico de DRE

EGL: Eminencia gangliónica lateral.

EGM: Eminencia gangliónica medial.

GFAP: *Glial fibrillary acidic protein*. Proteína ácida fibrilar de la glía.

GLAST: *Glutamate astrocyte specific transporter*. Transportador de glutamato específico de astrocitos.

HD: Homeodominio.

IL-6: Interleucina 6.

LIF: *Leukemia inhibitory factor*. Factor inhibitorio de la leucemia.

NCOR: *Notch corepressor*. Correpresor de Notch.

NFI: Factor nuclear I.

NGF: *Nerve growth factor*. Factor de crecimiento del nervio.

NICD: *Notch intracellular domain*. Dominio intracelular de Notch.

NT3: *Neurotrophin 3*. Neurotrofina 3.

PACAP: *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*. Péptido hipofisario activador de la adenilato ciclasa.

PDGF: *Platelet-derived growth factor*. Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

VIP: *Vasoactive intestinal peptide*. Péptido intestinal vasoactivo.

ZSV: Zona subventricular.

ZV: Zona ventricular.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1.1 Diferenciación celular en el SNC.

Los dos tipos celulares que constituyen el sistema nervioso central (SNC), las neuronas y las células gliales (astrocitos y oligodendrocitos), se generan durante el desarrollo embrionario a partir de las mismas células progenitoras (Temple and Qian, 1996; McKay, 1997; Rao, 1999; Gage, 2000; Molne et al., 2000). La neurogénesis ocurre en primer lugar y comienza a mediados de la gestación, mientras que la gliogénesis se extiende desde la fase final del periodo embrionario hasta el periodo postnatal (Bayer, 1991; Jacobson, 1991). Este desfase permite que la población de células gliales pueda ajustarse al número de neuronas generadas previamente (Miller and Gauthier, 2007).

Experimentos *in vitro* han demostrado que los progenitores neurales son células multipotenciales capaces de generar tanto neuronas como astrocitos en respuesta a distintos factores neurotróficos (Johe et al., 1996; Temple and Qian, 1996; McKay, 1997; Rao, 1999; Gage, 2000; Molne et al., 2000). Los factores neurotróficos presentes durante el desarrollo se encargan, en parte, de inducir un determinado fenotipo celular. Así, por ejemplo, el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF, *basic fibroblast growth factor*) promueve la proliferación y mantiene el fenotipo de las células progenitoras (Ray et al., 1993; Gage et al., 1995; Ghosh and Greenberg, 1995; Vicario-Abejón et al., 1995; Cavanagh et al., 1997). Promueven la diferenciación neuronal las neurotrofinas, entre las que se encuentran el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*), la neurotrofina 3 (NT3, *neurotrophin 3*) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *platelet-derived growth factor*) (Ghosh and Greenberg, 1995; Vicario-Abejón et al., 1995; Johe et al., 1996). Por el contrario, las acciones del factor neurotrófico ciliar (CNTF, *ciliary neurotrophic factor*), del factor inhibitorio de la leucemia (LIF, *leukemia inhibitor factor*), de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs, *brain morphogenetic proteins*) o del péptido hipofisario activador de la adenilato ciclasa (PACAP, *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) inducen la diferenciación de astrocitos (Gross et al., 1996; Johe et al., 1996; Richards et al., 1996; Bonni et al., 1997; Vallejo and Vallejo,

2002). En el caso de los oligodendrocitos, su diferenciación requiere la acción de las hormonas tiroidea y esteroides (Barres et al., 1994; Johe et al., 1996).

La capacidad de diferenciación de estos factores está relacionada con la edad embrionaria de los precursores sobre los que actúan. PACAP, por ejemplo, tiene efecto antimitótico e induce la diferenciación neuronal en estadios tempranos del desarrollo (Lu and DiCicco-Bloom, 1997; Nicot and DiCicco-Bloom, 2001; Suh et al., 2001; Carey et al., 2002), mientras que en estadios más tardíos, como hemos visto, promueve astrogénesis. Además, el patrón de expresión de determinados factores de transcripción y la jerarquía existente entre las distintas señales y sus vías de señalización también influyen sobre la capacidad de diferenciación de los factores neurotróficos. (Park et al., 1999; Schmid et al., 2003; Rowitch, 2004).

Durante el desarrollo del SNC los precursores neurales multipotenciales se encuentran situados en la zona ventricular del tubo neural, formando un epitelio pseudoestratificado denominado neuroepitelio. Las células neuroepiteliales presentan una morfología bipolar muy característica que se extiende radialmente desde la zona ventricular hasta la superficie pial, y que, a finales del siglo XIX, ya fueron descritas por diferentes autores como Ramón y Cajal, Magini, Kölliker, His y Retzius (Bentivoglio and Mazzarello, 1999).

El término “glía radial” fue acuñado por Pasko Rakic para definir este tipo celular tras comprobar que expresan la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) en primates (Levitt and Rakic, 1980). Con el tiempo, se han encontrado nuevos marcadores que ponen de manifiesto el carácter glial de estas células, como el transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST, *glutamate astrocyte specific transporter*) (Shibata et al., 1997), las proteínas de unión a lípidos del cerebro (BLBP, *brain lipid-binding protein*) (Feng and Heintz, 1995) y el filamento intermedio nestina (Hockfield and McKay, 1985).

Inicialmente se pensó que el papel funcional de este tipo celular era sustentar y dirigir de forma radial la migración de las neuronas en el tejido nervioso en desarrollo (Rakic, 1972; Hatten, 2002). Estudios recientes han demostrado que las células de la glía radial son las que actúan como verdaderos precursores neurales, pudiendo generar tanto neuronas como células gliales (Malatesta et al., 2000; Miyata et al., 2001; Campbell and Götz, 2002; Götz et al., 2002; Noctor et al., 2002; Kriegstein and Götz, 2003). Otro dato que pone de manifiesto esta capacidad precursora es que la glía radial expresa nestina (Misson et al., 1988; Chanas-Sacre et al., 2000; Hartfuss et al., 2001) y

vimentina (Pixley and de Vellis, 1984), que son marcadores de células progenitoras indiferenciadas del SNC en desarrollo.

1.2. Bases moleculares de la neurogénesis.

La neurogénesis es el proceso por el cual los precursores neurales generan las neuronas que compondrán el sistema nervioso. En este proceso intervienen factores de transcripción expresados por los precursores neurales y señales extrínsecas a las que responden específicamente. En los siguientes apartados se discutirán estos dos aspectos.

1.2.1 Determinación mediante factores de transcripción.

Los factores de transcripción de tipo bHLH y de tipo homeodominio juegan un papel crucial en los programas genéticos que controlan la especificación y generación de la diversidad neuronal en el sistema nervioso. Aunque ejercen funciones bien diferenciadas que se explicarán a continuación, se han descrito procesos cooperativos entre ambos a nivel de promotor. Así, se ha identificado interacciones entre proteínas bHLH (Ngn2, NeuroM) y proteínas homeodominio de tipo LIM (Isl1, Lhx3, NLI) en la regulación de la expresión del gen *Hb9* expresado en motoneuronas (Lee and Pfaff, 2003). Más recientemente, se ha descrito que este tipo de interacción está regulada por modificaciones post-traduccionales en alguna de las proteínas bHLH (Ma et al., 2008).

1.2.1.1 Genes proneurales de tipo bHLH.

Ciertos genes proneurales, entre los que se encuentran *mash1*, *ngn1*, *ngn2*, *ngn3* y *math1*, codifican factores de transcripción con dominio básico de tipo hélice-lazo-hélice (bHLH, *basic helix loop helix*). Su expresión es necesaria y suficiente para promover la neurogénesis (Bertrand et al., 2002; Ross et al., 2003), y consolida el carácter neuronal de los precursores indiferenciados (Tomita et al., 2000; Nieto et al., 2001; Sun et al., 2001). Además, los genes bHLH están implicados en procesos de diferenciación, migración y especificación de distintos subtipos neuronales (Bertrand et al., 2002; Helms and Johnson, 2003; Schuurmans et al., 2004; Hand et al., 2005). Por ejemplo, la expresión de *mash1* y *ngn2* en progenitores corticales del cerebro anterior promueve su diferenciación a neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas, respectivamente (Parras et

al., 2002; Berninger et al., 2007), mientras que la expresión de *ngn2* en progenitores de la médula espinal induce su diferenciación a neuronas motoras (Mizuguchi et al., 2001).

Las proteínas codificadas por éstos genes proneurales también controlan procesos tardíos de la neurogénesis, como son la detención de la división celular de los progenitores (Farah et al., 2000; Mizuguchi et al., 2001; Nakada et al., 2004), la migración de las neuronas jóvenes fuera de la región ventricular y su diferenciación terminal (Nakada et al., 2004; Hand et al., 2005; Berninger et al., 2007).

Experimentos realizados con cultivos celulares clonales pusieron de manifiesto que los factores de transcripción bHLH inducen la diferenciación neuronal al tiempo que inhiben la diferenciación astrocitaria (Nieto et al., 2001; Parras et al., 2004). Estas dos funciones son independientes. Así, *Ngn1* promueve la neurogénesis a través de la activación transcripcional de genes diana como *neuroD*, otro factor bHLH, mientras que previene la inducción de astrogliogénesis mediante la inhibición de las vías de señalización gliogénicas dependientes de la activación de los sistemas JAK-STAT y BMP-SMAD (Sun et al., 2001; He et al., 2005).

Aún no se conocen los mecanismos exactos por los que los genes proneurales son capaces de conducir a los progenitores hacia un fenotipo neuronal. Sin embargo, estudios llevados a cabo en la retina, en el corteza cerebral y en la médula espinal en desarrollo demuestran que *Ngn2* es capaz de regular la expresión de genes codificantes de factores de transcripción de las familias bHLH, T-Box y SoxB1, todos ellos implicados en el proceso de diferenciación neuronal (Schuurmans et al., 2004; Matter-Sadzinski et al., 2005; Bergsland et al., 2006).

La inducción de la neurogénesis por neurogenina 1 y 2 requiere la expresión de los factores de transcripción de la familia NeuroD. Se ha observado que *neuroD* y el gen relacionado *math2/nex* están implicados en la diferenciación terminal de las neuronas del giro dentado del hipocampo (Miyata et al., 1999; Liu et al., 2000), en la neurogénesis en el hipocampo adulto (Deisseroth et al., 2004; Tozuka et al., 2005) y en la morfogénesis dendrítica de las neuronas del cerebelo (Gaudilliere et al., 2004).

En el caso de los genes SoxB1 (*Sox1*, *Sox2* y *Sox3*), se ha comprobado que son esenciales para el mantenimiento de la proliferación y el carácter multipotencial de los progenitores neurales. Está descrito que, para que la neurogénesis pueda llevarse a cabo, las proteínas proneurales primero deben de inhibir la expresión de los genes SoxB1, al tiempo que activan la transcripción de Sox21, un antagonista de los genes Sox (Bylund et al., 2003; Sandberg et al., 2005).

1.2.1.2 Factores de transcripción de tipo homeodominio.

Los factores de transcripción de tipo homeodominio controlan numerosos procesos morfogénéticos embrionarios. Se caracterizan por poseer un dominio de unión a ADN muy conservado que da nombre a esta familia. Son fundamentales para la regionalización y para la determinación de la identidad neuronal durante el desarrollo del SNC. Así, por ejemplo, la expresión de *Dbx2* delimita las regiones dorsal y ventral de la médula espinal, donde se expresan *Pax6* y *Nkx2.2*, respectivamente (Jessell, 2000). Igualmente, la expresión mutuamente excluyente de *Otx2* y *Gbx2* define la frontera entre el mesencéfalo y el rombencéfalo (Li and Joyner, 2001). En el telencéfalo dorsal, la expresión de las homeoproteínas *Pax6*, *Emx1* y *Emx2* son importantes para la especificación del *pallium* dorsal, estructura embrionaria que dará lugar al neocorteza cerebral (Bishop et al., 2002). En el telencéfalo ventral, la especificación regional de las eminencias gangliónicas lateral y medial, primordios de los ganglios basales, está asociada a la expresión de *Gsh1/2* y *Dlx1/2*, en el caso de la eminencia gangliónica lateral, y de *Nkx2.1* y *Lhx6/7* en el caso de la medial (Schuurmans and Guillemot, 2002).

Los genes de tipo homeodominio también intervienen en la especificación de la identidad neuronal. Por ejemplo, *Isl1*, un factor de transcripción de tipo homeodominio de clase LIM, especifica el dominio de progenitores que darán lugar a las motoneuronas del asta anterior de la médula espinal (Jessell, 2000); y *Phox2A*, otro factor de tipo homeodominio, especifica la generación de neuronas noradrenérgicas A6 del *locus coeruleus* (Morin et al., 1997).

Por tanto, durante la neurogénesis, las proteínas bHLH y las de tipo homeodominio intervienen en la inducción de la neurogénesis y en la adquisición de la identidad neuronal, respectivamente.

1.2.1.3 Factores de transcripción de la familia Dlx.

Dentro del grupo de los factores de transcripción de tipo homeodominio, centraremos nuestra atención a continuación sobre la familia *Dlx*. Esta familia está compuesta por proteínas codificadas por genes de tipo relacionados con la familia de genes homeóticos *Distal-less* de *Drosophila melanogaster* (Panganiban and Rubenstein, 2002).

1.2.1.3.1 Características generales.

Hasta la fecha se han descrito en mamíferos seis miembros de la familia: *Dlx1*, *Dlx2*, *Dlx3*, *Dlx4*, *Dlx5* y *Dlx6* (Porteus et al., 1991; Price et al., 1991; Robinson et al., 1991; Robinson and Mahon, 1994; Simeone et al., 1994; Weiss et al., 1994; Scherer et al., 1995; Nakamura et al., 1996; Stock et al., 1996). En el genoma, estos genes se encuentran formando asociaciones bigénicas en las que *Dlx1* se asocia con *Dlx2*, *Dlx3* con *Dlx4* y *Dlx5* con *Dlx6*. Las regiones intergénicas de cada par de genes contienen elementos reguladores que modulan coordinadamente su expresión (Zerucha et al., 2000; Sumiyama et al., 2002).

Durante el periodo intermedio de la gestación del ratón, diferentes genes de la familia *Dlx* se expresan en tejidos derivados del ectodermo: el SNC y la superficie del ectodermo. En el caso del SNC, hasta la fecha solo se ha descrito la expresión de cuatro miembros, *Dlx1*, *Dlx2*, *Dlx5* y *Dlx6* (Price et al., 1991; Robinson et al., 1991; Dolle et al., 1992; Bulfone et al., 1993; Simeone et al., 1994; Liu et al., 1997; Yang et al., 1998; Eisenstat et al., 1999). La expresión de estos cuatro genes está restringida al cerebro anterior y, en el telencéfalo, su expresión sigue una secuencia temporal: *Dlx2*, *Dlx1* y *Dlx5*, y por último *Dlx6* (Liu et al., 1997; Eisenstat et al., 1999; Zerucha and Ekker, 2000). Este orden de expresión está asociado a la diferenciación de los precursores neuroepiteliales: *Dlx2* se expresa en las células neuroepiteliales de la zona ventricular; *Dlx2*, *Dlx1* y *Dlx5* se expresan conjuntamente en la mayoría de las células subventriculares; y *Dlx5* y *Dlx6* se expresan en muchas de las neuronas ya diferenciadas (Liu et al., 1997; Eisenstat et al., 1999).

Los genes de la familia *Dlx* también se expresan jerárquicamente en las células derivadas de la cresta neural craneal (Dolle et al., 1992; Bulfone et al., 1993; Robinson and Mahon, 1994; Simeone et al., 1994; Qiu et al., 1997; Yang et al., 1998). Estas células migran a los arcos branquiales y son importantes para el desarrollo de la estructura esquelética y tejido conectivo facial (Depew et al., 2002). También se expresan en dominios discretos tanto de origen neural como no neural de la superficie del ectodermo. Estos son los casos del par *Dlx1/2*, que se expresan en precursores neuronales y neuronas de la retina embrionaria, y de grupo *Dlx2/3/5/6* en la placa y vesícula óticas (Dolle et al., 1992; Robinson and Mahon, 1994; Liu et al., 1997; Eisenstat et al., 1999; Quint et al., 2000; Zhao et al., 2000; Depew et al., 2002).

En estadios más tardíos del desarrollo, los genes *Dlx* están implicados en la diferenciación esquelética de los compartimentos ectodérmico y mesodérmico de los

dientes en desarrollo (Zhao et al., 2000; Depew et al., 2002) y del tejido derivado de la cresta neural (Simeone et al., 1994; Yang et al., 1998; Acampora et al., 1999; Zhao et al., 2000).

1.2.1.3.2 Funciones de los genes *Distal-less* durante el desarrollo del SNC.

Se ha realizado estudios en animales modificados genéticamente para investigar la función de diferentes genes *Dlx*. Así, se ha comprobado que los ratones en los que se ha eliminado un gen *Dlx* en homocigosis mueren durante la embriogénesis. Estos ratones presentan deficiencias en la formación y desarrollo de diversos órganos y estructuras embrionarias. Sin embargo, otros tejidos en los que se coexpresan normalmente otros miembros de la familia *Dlx* no presentan alteraciones (Anderson et al., 1997a; Anderson et al., 1997b; Qiu et al., 1997; Acampora et al., 1999; Depew et al., 1999). Las alteraciones en los órganos o tejidos en los que esto ocurre son sólo detectables si se han mutado o eliminado al menos dos genes *Dlx* del mismo par, como por ejemplo *Dlx1* y *Dlx2* (Qiu et al., 1997; Robledo et al., 2002; Solomon and Fritz, 2002). Por lo tanto, estos estudios han puesto de manifiesto funciones específicas y funciones redundantes entre los miembros de la familia de genes *Dlx*.

Durante el desarrollo del telencéfalo, los genes *Dlx* se expresan en neuronas GABAérgicas (Anderson et al., 1997b; Stuhmer et al., 2002b; Stuhmer et al., 2002a). En los ratones carentes de los genes *Dlx1* y *Dlx2* se han descrito alteraciones en la diferenciación y migración tangencial de las interneuronas GABAérgicas generadas en el *subpallium*. En dichos ratones, la diferenciación de neuronas subcorticales y de varios tipos de interneuronas GABAérgicas, dopaminérgicas y colinérgicas se encuentra bloqueada (Qiu et al., 1995; Marín et al., 2000; Pleasure et al., 2000; Anderson et al., 2001). Así mismo, los procesos de migración tangencial desde las eminencias gangliónicas medial y lateral al neocórtex cerebral y bulbo olfatorio, respectivamente, se encuentran afectados (Anderson et al., 1997a; Lavdas et al., 1999; Marín et al., 2000; Anderson et al., 2001; Marín and Rubenstein, 2001).

Estudios más recientes realizados con ratones deficientes en *Dlx1* y *Dlx2* han puesto de manifiesto la importancia de ambos genes en el proceso de migración tangencial de las interneuronas corticales. Uno de estos estudios demuestra que *Dlx1* y *Dlx2* actúan reprimiendo transcripcionalmente el gen de la Neuropilina 2, un receptor de semaforinas de clase III, cuya función consiste en inhibir la migración tangencial de las neuronas (Le et al., 2007). Otro estudio refleja cómo *Dlx1* y *Dlx2* controlan el

crecimiento de las neuritas en las neuronas en fase de migración tangencial. La longitud de las dendritas de las interneuronas carentes de *Dlx1* y *Dlx2* se encuentra incrementada e impide su migración (Cobos et al., 2007).

En resumen, los genes *Dlx* presentan redundancias funcionales y estructurales, e intervienen en numerosos procesos embrionarios entre los que destaca el desarrollo del telencéfalo y la determinación celular de las interneuronas corticales que nacen en las eminencias gangliónicas.

1.2.1.3.3 Dlx4.

La homeoproteína Dlx4, previamente denominada Dlx7, Dlx8 ó Dlx9 por distintos investigadores, es uno de los miembros menos conocidos de la familia de factores de transcripción Dlx, y al que se le han dedicado menos estudios.

El ADNc de Dlx4 humano se clonó a partir de líneas celulares humanas de leucemia y sirvió de guía para clonar su homólogo en ratón (Nakamura et al., 1996). Dlx4 también se clonó a partir de una genoteca de ADNc de placenta humana (Quinn et al., 1997) y se ha encontrado que se expresa en varias líneas celulares derivadas de tumores. Hasta el momento se han descrito dos isoformas de Dlx4, una denominada isoforma 1, de 32 KDa, y otra conocida como isoforma 2, de 24 KDa. La isoforma 1, denominada también *Beta Protein 1* (BP-1) es un represor del gen humano de la β -globina, mientras que la isoforma menor carece de actividad represora (Fu et al., 2001; Chase et al., 2002). Ambas isoformas comparten las regiones correspondientes al homeodominio y al extremo carboxilo-terminal, y divergen en la región amino-terminal, lo que sugiere un posible mecanismo de “*splicing*” alternativo (Fu et al., 2001) (Figura 1).

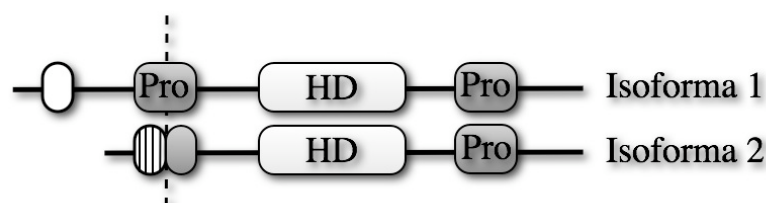


Figura 1. Esquema que representa las isoformas proteicas 1 y 2 de Dlx4 y los principales dominios presentes en ambas. La línea punteada indica el punto de divergencia en el extremo amino terminal. **Pro:** Dominio rico en prolina; **HD:** homeodominio.

Hasta la fecha solo se ha descrito su expresión en tejidos periféricos como la placenta, la estructura mandíbulo-dental embrionaria y la médula ósea adulta (Weiss et al., 1995; Quinn et al., 1997; Davideau et al., 1999; Haga et al., 2000; Chase et al., 2002; Gritli-Linde et al., 2002). Además, está documentado que, en tumores humanos como el cáncer de mama, el de colon, las leucemias linfoides y mieloides, y el cáncer de ovario, *Dlx4* presenta alteraciones significativas en sus niveles de expresión (Fu et al., 2003; Neufing et al., 2003; Hollington et al., 2004; Man et al., 2005; Hara et al., 2007; Stevenson et al., 2007). También se ha descrito su implicación en procesos apoptóticos (Shimamoto et al., 1999, 2000; Ferrari et al., 2003) y de metástasis (Tomida et al., 2007). Por el contrario, hasta la fecha, no se ha documentado evidencia alguna que indique que *Dlx4* se exprese en el SNC, donde el resto de la familia de los genes *Dlx* parece jugar un importante papel.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio anteriores al comienzo de esta tesis permitieron aislar, a partir de células de origen neural, un fragmento de ADNc que codifica *Dlx4*. Estos trabajos mostraron que *Dlx4* se expresa en el SNC de la rata tanto durante el desarrollo embrionario como en el animal adulto. Además, se comprobó que los patrones de expresión temporal y espacial de *Dlx4* son muy diferentes a los de *Dlx2* y *Dlx5* (Figura 2).

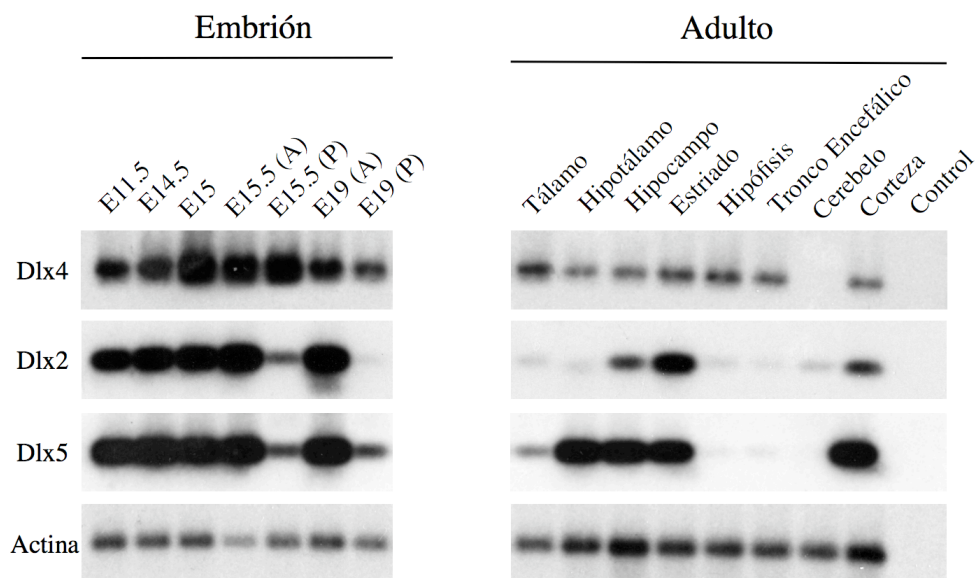


Figura 2. RT-PCR/Southern Blot que muestra los distintos niveles de expresión de *Dlx4* en el SNC de embriones de rata de diferentes edades de gestación y en distintas regiones del cerebro de rata adulta. Los tejidos embrionarios corresponden a cerebro completo (sin indicar), cerebro anterior (A) o cerebro posterior (P), a excepción de E11.5 que corresponde a la cabeza del embrión. Nótese que el patrón de expresión de *Dlx4* es significativamente diferente de los que exhiben *Dlx2* y *Dlx5*, otros dos miembros de la familia *Dlx* que se muestran comparativamente.

Por último, en estudios realizados utilizando una línea celular de origen neural para explorar la posibilidad de que la expresión de *Dlx4* pudiera estar regulada por algunos factores neurotróficos, se observó que la citoquina CNTF, un potente inductor de la astrogénesis, es capaz de activar de forma significativa la expresión de *Dlx4* (Figura 3).

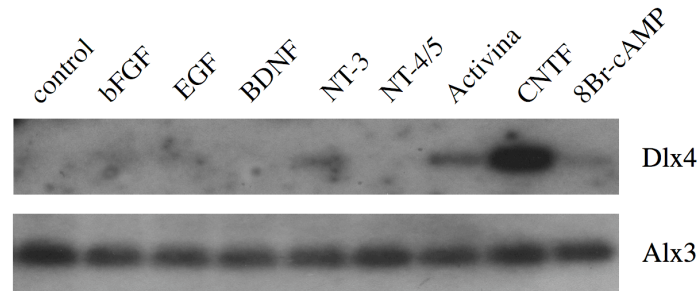


Figura 3. RT-PCR/Southern Blot realizado a partir de ARNm de células de la línea monoclonal RC2.E10 tratadas con diferentes factores neurotróficos. Nótese que CNTF estimula la expresión de *Dlx4* con alto grado de especificidad.

Estos datos constituyen el punto de partida para el estudio de la participación de *Dlx4* en el desarrollo del SNC que hemos realizado y que se describe en la presente tesis doctoral.

1.2.2. Determinación mediante mecanismos de señalización.

Independientemente del papel regulador y a veces determinante de los factores de transcripción, la diferenciación neuronal durante el desarrollo embrionario del SNC también está regulada mediante mecanismos de señalización inducidos por factores extracelulares. Entre ellos cabe destacar los siguientes:

1.2.2.1. Neurotrofinas.

Los precursores neurales secretan pequeñas proteínas, denominadas neurotrofinas, capaces de promover la diferenciación y la supervivencia neuronal. Hace 50 años se identificó la primera neurotrofina, el factor de crecimiento del nervio (NGF, *nerve growth factor*), y su capacidad de promover el crecimiento de las prolongaciones neuronales (Cohen and Levi-Montalcini, 1956; Cohen, 1959). Desde entonces, se han identificado el BDNF, la NT3 y NT4/5 (Barde et al., 1982; Ernfors et al., 1990; Berkemeier et al., 1991; Ip et al., 1992). Las neurotrofinas actúan uniéndose a dos clases de receptores transmembrana, el receptor de neurotrofinas p75 (p75^{NTR}) y la familia de receptores tirosina quinasa (Trk) compuesta por los receptores TrkA, TrkB y

TrkC. Mientras que el receptor p75^{NTR} presenta una afinidad similar para todas las neurotrofinas, cada receptor Trk reconoce de manera selectiva a cada una de las neurotrofinas.

La acción neurogénica de las neurotrofinas se puso inicialmente de manifiesto en experimentos de diferenciación *in vitro*. Por ejemplo, BDNF y NT-3 son capaces de promover la diferenciación neuronal tanto de precursores de hipocampo embrionario como de precursores corticales (Ghosh and Greenberg, 1995; Vicario-Abejón et al., 1995). Experimentos llevados a cabo con cultivos de precursores corticales demostraron que la inhibición de las neurotrofinas endógenas con anticuerpos específicos provoca una disminución en la tasa de supervivencia, la proliferación y la diferenciación neuronal de los progenitores (Barnabe-Heider and Miller, 2003). Además, en procesos neurogénicos en edad adulta, BDNF promueve la supervivencia de las nuevas neuronas y la migración de los progenitores subventriculares (Kirschenbaum and Goldman, 1995; Chiaramello et al., 2007).

Además de las neurotrofinas propiamente dichas, existen otros factores solubles, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), capaces de promover la diferenciación neuronal (Johe et al., 1996; Williams et al., 1997).

1.2.2.2. Señalización por Wnt.

Las proteínas Wnt conforman una familia muy conservada de proteínas que ejerce múltiples funciones relevantes para la determinación de la especialización regional y del patrón celular del cerebro anterior, y es fundamental en el proceso de regionalización dorso-ventral del telencéfalo (Rubenstein, 2000; Backman et al., 2005).

La proteínas Wnt son secretadas a la matriz extracelular y se unen específicamente a la familia de receptores Frizzled y LRP, activando dos tipos de vías de señalización denominadas canónica y no canónica. La vía canónica inhibe la fosforilación de la proteína β -catenina e impide su degradación, lo que provoca su acumulación en el citosol. Como consecuencia de ello, la β -catenina se transloca al núcleo donde se une a miembros de la familia de factores de transcripción LEF/TCF, y de esta manera participa en procesos de regulación de la expresión génica.

En estadios tempranos del desarrollo cortical, la señalización canónica de Wnt promueve la proliferación celular. Se ha observado que la sobreexpresión de β -catenina estimula la proliferación de los progenitores neuronales (Chenn and Walsh, 2003).

Contrariamente, la eliminación condicional de β -catenina en la corteza cerebral conlleva una depleción de dichos progenitores (Backman et al., 2005). En cambio, en fases más tardías del desarrollo cortical ($> E13.5$), la sobreexpresión de Wnt7A o de β -catenina provoca la parada del ciclo celular y la diferenciación neuronal de los progenitores corticales. La participación de Wnt en procesos de neurogénesis también se ha puesto de manifiesto en experimentos en los que se han sobre expresado Axina y Dkk1, dos inhibidores de la señalización por Wnt, que impiden la diferenciación neuronal (Hirabayashi et al., 2004). Además, se ha comprobado que el complejo β -catenina/TCF puede activar directamente los promotores de los genes proneurales *ngn1* y *ngn2* (Hirabayashi et al., 2004), de forma que si se elimina específicamente el gen β -catenina de la corteza cerebral, la expresión de Ngn2 se ve comprometida (Machon et al., 2003).

Los mecanismos que regulan las dos actividades de Wnt que hemos mencionado, es decir, la estimulación de la proliferación de las células progenitoras por un lado, y por otro la facilitación de la diferenciación son aún desconocidos, aunque se ha propuesto que la presencia o no de bFGF puede jugar un papel determinante (Israsena et al., 2004).

La vía no canónica de señalización por Wnt es independiente de β -catenina y es importante para el movimiento polarizado de las células y la organogénesis. Hasta lo que se conoce, la vía no canónica de Wnt puede actuar de dos formas, por un lado, liberando calcio intracelular y activando las quinasas CamKII y PKC, y por otro, a través de las GTPasas de la familia Rho y la quinasa JNK y.

En conclusión, la existencia de señales extracelulares mediadas por las neurotrofinas y la señalización dependiente de Wnt contribuyen a promover y regular el proceso de neurogénesis.

1.3 Migración neuronal en el telencéfalo.

Las neuronas inmaduras que se han diferenciado adquiriendo ya un fenotipo concreto migran desde las regiones progenitoras (zonas ventricular y subventricular; ZV y SZV, respectivamente), hasta regiones más externas del SNC, donde se integrarán en los diferentes circuitos cerebrales (Hatten, 2002). Estos procesos migratorios pueden ser de dos tipos, radial y tangencial, en función de la orientación del movimiento.

En el caso de la migración radial está demostrado que las neuronas inmaduras de la zona ventricular utilizan las fibras de la glia radial a modo de guía, utilizando sus somas como verdaderos raíles por los que discurren hasta alcanzar sus capas de destino (Rakic, 1974; Edmondson and Hatten, 1987; Gregory et al., 1988; Mason et al., 1988; Misson et al., 1991; Miyata et al., 2001).

En la corteza cerebral en desarrollo, las primeras neuronas generadas en la ZV migran radialmente para formar la preplaca (Allendoerfer and Shatz, 1994). La siguiente oleada de neuronas provenientes de la ZV formará la placa cortical, la cual divide la preplaca en dos capas, la zona marginal y la subplaca, respectivamente. Al mismo tiempo que se forma la preplaca, en la zona marginal, se forma una importante y característica población de neuronas denominadas de Cajal-Retzius. Estas neuronas expresan la proteína relina, importante para los procesos de migración y posicionamiento del resto de neuronas en la corteza cerebral. A medida que la corteza cerebral se desarrolla, nuevas oleadas de neuronas dejan la ZV para formar nuevas capas corticales, hasta un total de seis. De esta manera, las neuronas más jóvenes en las capas más externas y las neuronas más maduras en las capas más internas. La importancia de la relina en la ordenación y migración de las neuronas ha quedado puesta de manifiesto en los ratones “*reeler*” carentes del gen *Reln* que codifica la relina. Estos ratones presentan un correcto número de capas de neuronas, pero éstas están dispuestas en sentido inverso, de manera que las neuronas más jóvenes se encuentran más alejadas de la zona marginal y las más maduras se localizan en las capas más superficiales (Caviness, 1976).

Independientemente de lo anterior, estudios realizados por diversos investigadores demostraron que no todas las neuronas migran radialmente, sino que algunas lo hacen de forma tangencial (Altman, 1969; Rakic and Sidman, 1969; Austin and Cepko, 1990; O'Rourke et al., 1992; Walsh and Cepko, 1992). Hoy está establecido que la migración tangencial es otro mecanismo general de migración celular durante el desarrollo del SNC. Es característica de los vertebrados, especialmente importante en el telencéfalo, y contribuye a incrementar la complejidad de los circuitos neuronales (Marín and Rubenstein, 2001; Lopez-Bendito et al., 2006)

La migración tangencial comprende varias formas de movimiento en función del sustrato utilizado por las células para moverse. Así, las neuronas en movimiento pueden utilizar otras neuronas como soporte, como hacen las interneuronas del bulbo olfatorio. Otras veces, las células se sirven de axones en crecimiento para alcanzar su destino

final. O también, como ocurre con las interneuronas que migran del *subpallium* al *pallium*, dos estructuras embrionarias que darán lugar a los ganglios basales y a la corteza cerebral respectivamente, se desconoce el sustrato utilizado, siendo su migración independiente de interacciones con la glía radial (Marín and Rubenstein, 2003).

En el telencéfalo, muchas de las neuronas que migran tangencialmente hacia el neocorteza cerebral y el hipocampo proceden de diferentes dominios progenitores del *subpallium* (de Carlos et al., 1996; Lavdas et al., 1999; Anderson et al., 2001; Marín and Rubenstein, 2001). La mayoría de las neuronas que migran tangencialmente hacia la corteza cerebral son interneuronas GABAérgicas de tipo inhibitorio (Cobos et al., 2001; Anderson et al., 2002), que proceden de la eminencia gangliónica medial (EGM). Estas interneuronas, cuando alcanzan su lugar apropiado en el corteza cerebral, se sirven de la glía radial para moverse radialmente hasta su correspondiente capa cortical (Polleux et al., 2002; Marín et al., 2006). Al contrario que las neuronas de proyección, la distribución intracortical de las interneuronas es independiente de la señalización por relina (Pla et al., 2006) y, aunque su mecanismo de distribución aún es desconocido, recientemente se ha encontrado que la señalización por la quimioquina CXCL12 es importante para la distribución intracortical final de las interneuronas GABAérgicas (Lopez-Bendito et al., 2008).

Los diferentes dominios progenitores del telencéfalo subpalial, y con ellos las distintas rutas migratorias, quedan delimitados por la expresión, mutuamente represiva, de distintos factores de transcripción. El factor de transcripción Nkx2.1 especifica la población de progenitores de la EGM y su ausencia provoca que los progenitores adquieran un carácter dorsal similar al de los progenitores de la eminencia gangliónica lateral (EGL) (Sussel et al., 1999). La especificación de los progenitores de la EGL viene determinada por la expresión de los factores de transcripción Gsh2 y Pax6 (Corbin et al., 2000; Yun et al., 2001). Y como hemos visto anteriormente, la expresión de Dlx1 y Dlx2 es importante para la migración de las neuronas de las eminencias gangliónicas a la corteza.

La trayectoria de la migración tangencial de las neuronas está coordinada por señales químicas, de modo que, el balance entre factores químio-repulsivos del área preóptica y químio-atrayentes producidos en la corteza cerebral designa su orientación ventro-dorsal (Marín and Rubenstein, 2003). Además, se han descrito interacciones ligando/receptor que controlan la distribución de las interneuronas en las distintas

estructuras telencefálicas. Este es el caso de netrina/Dcc, Slit/Robo, semaforina/neuropilina y neuregulina-1/ ErbB4 (Livesey and Hunt, 1997; Skaliya et al., 1998; Yuan et al., 1999; Flames et al., 2004).

Recientemente, se ha descrito que los procesos de migración tangencial son fundamentales para permitir la formación de circuitos axonales entre distintas regiones del cerebro a través de zonas no permisivas. Así, se ha demostrado que la migración tangencial de un grupo de neuronas GABAérgicas de la EGL hacia regiones derivadas de la EGM permite crear un corredor por el que discurren los axones del circuito tálamo-cortical (Lopez-Bendito et al., 2006).

1.4. Bases moleculares de la generación de astrocitos.

Al igual que en la neurogénesis, durante la astrogénesis también existen factores intrínsecos que actúan intracelularmente y factores extrínsecos que actúan extracelularmente. Ambos son igualmente importantes para promover y regular la diferenciación de astrocitos.

1.4.1 Factores intrínsecos.

Los factores intrínsecos engloban los mecanismos de regulación génica por factores de transcripción y procesos epigenéticos durante la astrogliogénesis.

1.4.1.1 Genes Sox.

Los genes Sox comprenden una superfamilia de genes compuesta por 10 grupos (A-J) identificados por su homología con el factor para la determinación del sexo en mamíferos *Sry*. Están implicados en procesos relacionados con el desarrollo neural, esquelético y gonadal.

En el SNC, el grupo de genes Sox E, compuesto por los miembros Sox8, Sox9 y Sox10, juega un importante papel en los procesos de diferenciación de oligodendrocitos, células de Schwann y astrocitos de la médula espinal.

De los tres miembros Sox E, únicamente Sox9 se expresa en astrocitos inmaduros que emergen de la zona ventricular en la médula espinal embrionaria, y permanece en los astrocitos maduros (Stolt et al., 2003). La supresión de Sox9 provoca una pérdida de precursores de astrocitos de la materia gris de la médula espinal, mientras que los

precursores de la materia blanca se mantienen inalterados (Stolt et al., 2003). Esto significaría que Sox9 es importante para la especificación de subpoblaciones de astrocitos, y al contrario de lo que ocurre en la oligodendrogénesis, este papel no está compartido con otros genes Sox E. En la actualidad se desconoce si Sox 9 interacciona con factores de transcripción que forman parte de otras vías de señalización importantes para la diferenciación de astrocitos.

1.4.1.2 Factor nuclear I (NFI).

La familia del factor de transcripción NFI reúne un complejo grupo de proteínas codificadas por cuatro genes diferentes (NFI-A, NFI-B, NFI-C y NFI-X) que regulan la expresión génica gracias a la formación de heterodímeros entre sí (Gronostajski, 2000).

Se ha descrito que algunas de las isoformas de NFI están presentes en el SNC (Sumner et al., 1996; Chaudhry et al., 1997; Gray et al., 2004) y participan en la regulación de diversos genes neurales (Bedford et al., 1998; Wang et al., 2004). De hecho, las isoformas NFI-A y NFI-B son críticas para el inicio y sincronización de la astrogénesis en la médula espinal en desarrollo (Deneen et al., 2006). Estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron que NFI se une a un elemento regulador de la región proximal del promotor del gen GFAP que resulta ser importante para su activación transcripcional (Cebolla and Vallejo, 2006). Dicho trabajo puso de manifiesto que NFI se encuentra ocupando el promotor de *gfap* en células progenitoras corticales antes de que se induzca la diferenciación a astrocitos. Además, la mutación del sitio de unión de NFI impide parcialmente la activación del promotor de *gfap* tras el tratamiento con CNTF o PACAP. El mecanismo de acción de NFI sobre la transcripción del gen de *gfap* no se conoce, pero es posible que incluya procesos de remodelación de cromatina. De hecho, está descrito que en procesos de remodelado de la cromatina para la activación de genes específicos de tejido, NFI estabiliza los nucleosomas y dispone la cromatina en un estado transcripcionalmente activo (Lefevre et al., 2003; Belikov et al., 2004; Vicent et al., 2004).

1.4.1.3 Mecanismos epigenéticos.

Existen mecanismos intrínsecos que previenen la expresión prematura de GFAP y la diferenciación de astrocitos en fases relativamente tempranas del desarrollo del SNC. Durante la neurogénesis se ha observado que el dinucleótido CpG presente en el sitio de unión de STAT3 del promotor de *gfap* se encuentra metilado. Esta modificación en el

ADN impide la unión prematura de la forma activada de STAT3, clave en la inducción de astrogliogénesis (Takizawa et al., 2001). Así mismo, los promotores de los genes de *Stat1*, *gfap* y *s100β* se encuentran metilados durante la neurogénesis, lo que induce a pensar que esta modificación epigenética del ADN previene la generación prematura de astrocitos (Fan et al., 2005). Durante el periodo final de la neurogénesis (E14-E17), los sitios CpG de unión de STAT3 de los promotores de *gfap* y *s100β* comienzan a desmetilarse (Takizawa et al., 2001), lo cual confiere a los precursores la capacidad de responder a las señales gliogénicas mediadas por STAT3.

Otro mecanismo de regulación de la astrogliogénesis actúa sobre el estado transcripcional de la cromatina. Está descrito que la presencia de bFGF facilita el reclutamiento del complejo STAT3/p300/CBP en el promotor de *gfap* al inducir la metilación de la histona H3 (Song and Ghosh, 2004).

En definitiva, la astrogénesis requiere de diversos factores de transcripción y de estados transcripcionalmente permisivos de la cromatina para la diferenciación de astrocitos.

1.4.2 Vías de señalización que inducen astrogénesis.

Existen diversas señales neurotróficas capaces de inducir astrogliogénesis. Como veremos, algunas de estas señales interactúan entre sí a distintos niveles moleculares, lo que potencia su acción.

1.4.2.1 Astrogénesis en respuesta a citoquinas neurotróficas.

Hace poco más de una década que se conoce que CNTF y LIF, citoquinas de la familia de la interleucina 6 (IL-6), inducen *in vitro* la diferenciación de precursores neurales a astrocitos (Johe et al., 1996; Richards et al., 1996). Más recientemente, se comprobó que otro miembro de la misma familia, la cardiotropina-1 (CT-1), también es capaz de inducir la diferenciación de células neuroepiteliales fetales en astrocitos (Ochiai et al., 2001; Barnabe-Heider et al., 2005).

Estas citoquinas se unen a receptores compuestos por dos subunidades heterodiméricas, una de baja afinidad específica de ligando, LIFR β , y otra de mayor afinidad, denominada gp130, común a todos los receptores de la familia de citoquinas IL-6 (Ware et al., 1995). Estos receptores son esenciales para la astrogénesis, como ha quedado demostrado en experimentos en los que se han utilizado ratones carentes de

alguno de los genes que los codifican, ya que estos ratones pierden la capacidad de generar astrocitos (Koblar et al., 1998; Nakashima et al., 1999c).

La unión entre las citoquinas y el receptor provoca la activación de las quinasas Jano (JAK) asociadas al receptor gp130, que a su vez fosforilan a las proteínas STAT1 y STAT3. Una vez fosforiladas, STAT1 y STAT3 forman un heterodímero que se transloca al núcleo, donde se une a elementos reguladores de los promotores de *gfap* y *S100β*, activando su transcripción (Johe et al., 1996; Bonni et al., 1997; Koblar et al., 1998; Rajan and McKay, 1998; Nakashima et al., 1999c; Namihira et al., 2004; Barnabe-Heider et al., 2005). La activación transcripcional de estos genes astrogliales requiere, en parte, de la cooperación de las proteínas STATs con los cofactores p300/CBP. Esta interacción provoca la acetilación de las histonas y la remodelación de la cromatina a conformaciones transcripcionalmente activas (Kalkhoven, 2004).

Recientemente, se han abierto nuevas perspectivas en el estudio funcional de las citoquinas neurotróficas durante la astrogénesis. Aunque las neuronas recién generadas a partir de cultivos corticales *in vitro* pueden expresar CNTF, LIF y CT-1 con capacidad de generar de astrocitos, experimentos realizados *in vivo* demuestran que, en la corteza cerebral embrionaria, de las tres citoquinas solo se expresa CT-1 y que los ratones neonatales carentes del gen de CT-1 presentan un descenso del 50-75% en el número de astrocitos, algo que no ocurre con los ratones CNTF^{-/-} y LIF^{-/-}. Esta investigación, por tanto, demuestra que las neuronas de la corteza cerebral en desarrollo, a través de la secreción de CT-1, juegan un papel muy importante en la inducción de la astrogénesis *in vivo*. Este mecanismo estaría a favor de la hipótesis según la cual el número de neuronas puede influir en el inicio y la magnitud de la astrogénesis (Barnabe-Heider et al., 2005)..

1.4.2.2 Notch.

Notch es un receptor con un único dominio transmembrana, un dominio extracelular de unión a ligando y un dominio intracelular involucrado en la señalización.

La señalización por Notch es una de las más importantes durante el desarrollo y, en el caso del SNC, está bien establecida su importancia en el mantenimiento de los progenitores en un estado indiferenciado (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Mizutani and Saito, 2005). Sin embargo, recientemente, se ha descrito que Notch promueve la transformación de progenitores neuroepiteliales en glía radial y, posteriormente, su

diferenciación en astrocitos (Götz and Huttner, 2005). La expresión *in vivo* de formas constitutivamente activas de Notch promueve la astrogénesis en el cerebro adulto (Gaiano et al., 2000; Tanigaki et al., 2001)

La astrogliogénesis inducida por Notch se inicia con interacciones ligando/receptor entre células vecinas que provocan la proteólisis del dominio intracelular de Notch (NICD, *Notch intracellular domain*). NICD se transloca al núcleo y se asocia con el factor de transcripción CSL/CBF-1/RBP-Jk para transactivar el gen *gfap*, pero únicamente si la vía JAK/STAT se encuentra activa (Ge et al., 2002). En caso contrario, el gen de *gfap* se encuentra silenciado mediante la acción represora del complejo formado por CSL y correpresor de Notch (NCOR, *Notch corepressor*) (Hermanson et al., 2002).

Muchas de las acciones de Notch se encuentran mediadas por la familia de represores transcripcionales Hes, la cual incluye Hes1 y Hes5 en el SNC. Ambos son esenciales para mantener indiferenciados los precursores neuroepiteliales y la glía radial (Nakamura et al., 2000; Hatakeyama et al., 2004), posiblemente reprimiendo genes diana bien caracterizados como *ngn1*, *ngn2* y *mash1*.

1.4.2.3 BMPs.

Las BMP son citoquinas liberadas por las neuronas y los astrocitos (Chang et al., 2003) que pertenecen a la superfamilia de los factores de crecimiento TGF- β . En cultivos de progenitores tardíos (>E14), tanto BMP2 como BMP4, son capaces de inducir la diferenciación de astrocitos, a la vez que reprimen la diferenciación de neuronas y oligodendrocitos (Gross et al., 1996; Nakashima et al., 2001). BMP2, además, es capaz de inhibir la neurogénesis induciendo la expresión de factores de transcripción de tipo represor como Id1, Id3 y Hes5 (Nakashima et al., 2001).

Las moléculas de BMP se unen a receptores específicos de tipo treonin/serin quinasa denominados BMPr I y II. Esta unión ligando/receptor provoca que los receptores BMPr de tipo II fosforilen y activen a los de tipo I. Estos últimos transducen la señal mediante la fosforilación de los factores de transcripción Smad1, Smad5 y Smad8, lo cual promueve su asociación con Smad4. Estos heterodímeros de proteínas Smad se translocan al núcleo donde activan la expresión de *gfap* (Gross et al., 1996; Chen et al., 2004).

Por otro lado, BMP4 también es capaz de inducir la diferenciación glial a través de la fosforilación de STAT3 (Rajan and McKay, 1998). Poco tiempo después de este hallazgo se demostró que algunas citoquinas (CNTF y LIF) y BMPs (BMP2, BMP4 y BMP7) actúan de manera sinérgica a la hora de inducir la diferenciación de astrocitos (Nakashima et al., 1999b; Yanagisawa et al., 2001). Este efecto sinérgico tiene su base molecular en la formación de un complejo transcripcional entre Smad1, la forma activada de STAT3 y p300/CBP (Nakashima et al., 1999b; Nakashima et al., 1999a).

Del mismo modo, se ha descrito que la activación astrogliar por BMPs también implica la interacción con la vía de señalización de Notch. A nivel molecular, esta cooperación implica la asociación de Smad1 y NICD con los coactivadores p300 y P/CAF a nivel del promotor de *hes5* (Takizawa et al., 2003).

Por tanto, para que el proceso de astrogénesis tenga lugar es indispensable la activación de diversas vías de señalización que median la acción de diferentes proteínas solubles como citoquinas y BMPs, y de la vía de señalización Notch inducida por células vecinas.

1.4.2.4. PACAP Y DREAM.

PACAP pertenece a la familia de hormonas polipeptídicas a la que también pertenecen la secretina, el glucagón y el péptido intestinal vasoactivo (VIP, *vasoactive intestinal peptide*). En el SNC, tanto PACAP como PAC1, uno de los tres receptores a los cuales PACAP puede unirse, se expresan en las células progenitoras de la zona ventricular de la corteza cerebral embrionaria, fetal y postnatal (Tatsuno and Arimura, 1994; Lu and DiCicco-Bloom, 1997).

Estudios realizados en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que, en cultivos celulares de precursores corticales, PACAP induce la astrogliogénesis a través de la vía de señalización dependiente de AMPc (McManus et al., 1999; Vallejo and Vallejo, 2002). A su vez, el AMPc activa a las GTPasas Ras y Rap1 (Lastres-Becker et al., 2008) y provoca un aumento de la concentración intracelular de calcio, la cual induce la transactivación del gen *gfap*. Esta transactivación requiere necesariamente de la unión del factor de transcripción DREAM al promotor de *gfap*.

DREAM fue descrito originalmente en estudios de regulación de la expresión del gen de la *prodinorfina* en el cerebro (Carrión et al., 1998), donde actúa reprimiendo la expresión de este gen al unirse a un elemento regulador de su promotor denominado DRE (*downstream regulatory element*). DREAM tiene la capacidad de unir iones de

calcio a través de cuatro dominios tipo *EF-hands* que le confieren sensibilidad a la concentración celular de calcio (Braunewell and Gundelfinger, 1999; Carrión et al., 1999; Ledo et al., 2000). La unión de calcio a estos dominios provoca un cambio conformacional en DREAM (Carrión et al., 1999; Osawa et al., 2001), liberando el elemento DRE y permitiendo, entonces, la expresión génica.

Los recientes estudios realizados en nuestro laboratorio en cultivos primarios de precursores corticales demuestran que DREAM se une a dos elementos reguladores del promotor de *gfap*, denominados DRE1 y DRE2. En este caso, DREAM actúa como un transactivador transcripcional en respuesta al incremento de la concentración de calcio inducida por la activación del sistema PACAP-AMPC (Cebolla et al., 2008).

En parte de las investigaciones descritas en la presente tesis doctoral, se ha abordado el estudio de la función de DREAM durante la diferenciación de astrocitos *in vivo*.

Objetivos

OBJETIVOS

La hipótesis a evaluar en el trabajo que constituye la presente tesis doctoral es que DREAM y Dlx4 participan en los mecanismos que regulan la generación de astrocitos y neuronas, respectivamente, durante el desarrollo del SNC.

Para evaluar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Determinar la participación de DREAM en la diferenciación de astrocitos inducida por PACAP en células precursoras corticales.
2. Determinar la participación de DREAM en el proceso de generación de astrocitos *in vivo*.
3. Determinar si DREAM participa en el proceso de neurogénesis *in vivo*.
4. Determinar si Dlx4 participa en los mecanismos transcripcionales que regulan la expresión de GFAP.
5. Determinar el patrón de expresión de Dlx4 durante el desarrollo del telencéfalo y su posible relación con la diferenciación neural.

Materiales y métodos

MÉTODOS

3.1 Animales.

Para los experimentos descritos en esta tesis doctoral se emplearon ratas Wistar de 14 y 17 días de gestación y ratones carentes del gen *dream* entre 16 días de gestación y 3 meses de edad.

Los ratones carentes del gen *dream* (Cheng et al., 2002) fueron proporcionados por el Dr. J.M. Penninger (Universidad de Toronto, Canadá) y se mantuvieron con el fondo genético de la cepa C57BL/6J. El genotipo se comprobó mediante PCR a partir de ADN genómico de la cola (Cheng et al., 2002), utilizando el sistema comercial de extracción y amplificación genómica para tejidos REExtract-N-Amp[™] Tissue PCR Kit (Sigma). Para la reacción de PCR se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

mutante-directo	(5'-GACTGGGATAGACCAATGCGG-3')
mutante-reverso	(5'-CCGATTCGCAGCGCATCGCCTTC-3')
wt-directo	(5'-GACTGGGATAGACCAATGCGG-3')
wt-reverso	(5'-TCCATGGACTCCAATGGGGAC-3')

Las condiciones de PCR fueron: 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto. Tras finalizar el último ciclo, las muestras se mantuvieron durante 5 minutos a 72 °C . El tamaño del producto de PCR es aproximadamente de 600 bases para el alelo silvestre y 1,2 Kb para el alelo mutante.

3.2 Cultivos celulares.

Para los experimentos realizados en células se han utilizado dos líneas celulares establecidas (RC2.E10 y RH1.C4) y cultivos primarios de células derivadas de la corteza cerebral de embriones de rata y de ratón.

3.2.1 Células RC2.E10.

Las células RC2.E10 constituyen una línea celular monoclonal establecida en nuestro laboratorio a partir de cultivos primarios de corteza cerebral de ratas Sprague Dawley de 16 días de gestación (E16) (Schwartz and Vallejo, 1998). Presentan un fenotipo que corresponde al de precursores neurales que expresan nestina, y la activación del sistema de señalización intracelular dependiente de AMPc induce su diferenciación en astrocitos (McManus et al., 1999). Se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10%) inactivado por calor (Gibco), fungizona (1%) y penicilina/estreptomicina (1%) (Gibco), a 33 °C y en una atmósfera de CO₂ al 5%, en placas pretratadas con poli-D-ornitina.

3.2.2 Células RH1.C4.

Las células RH1.C4 constituyen una línea celular derivada de hipocampo fetal de rata Sprague Dawley de 16 días de gestación (E16) (Schwartz and Vallejo, 1998). Se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10%), fungizona (1%) y penicilina/estreptomicina (1%), a 33 °C y en una atmósfera de CO₂ al 5%, en placas pretratadas con poli-D-ornitina.

3.2.3 Cultivos celulares primarios.

Para la obtención de los cultivos celulares primarios se diseccionaron cortezas cerebrales de fetos de rata Wistar de 14 ó 17 días de gestación o, en su caso, cortezas cerebrales de embriones de ratones *dream*^{+/+} y *dream*^{-/-} de 16 días de gestación.

El tejido se disgregó mecánicamente con una pipeta P-200 en solución salina tamponada de Hank (HBSS, *Hank's balanced salt solution*) carente de Ca²⁺ y Mg²⁺ (Gibco) y se centrifugó a 1000 rpm. Este proceso se repitió una vez antes de sembrar las células a una densidad de 2-4 x 10⁴ células/cm² en placas de 100 mm tratadas previamente durante 15 minutos con poli-D-orinitina (15 µg/ml) (Sigma). Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10%), fungizona (1%) y penicilina/estreptomicina (1%). Tras 2 horas de incubación a 37 °C y 5% de CO₂ se retiró el medio, se lavaron cuidadosamente con PBS y se incubaron en medio DMEM (Gibco) sin suero que contenía Suplemento N1 para cultivos neurales (Sigma), piruvato sódico 1 mM, fungizona (1%), penicilina/estreptomicina (1%) (medio definido) y 20

ng/ml de bFGF (Prepotech Ltd). Las células se expandieron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 3 ó 4 días y el medio fue sustituido cada dos días.

Cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia se sembraron en placas de 60 mm a una densidad 10⁶ células/placa para posteriores ensayos. Para ello, las células se lavaron con PBS y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos con 4 ml de HBSS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺. Posteriormente, las células se levantaron mecánicamente con una pipeta P-1000.

Para los ensayos de diferenciación llevados a cabo en cultivos primarios de rata (E14 y E17), las células se mantuvieron en medio definido entre 20 horas y 10 días, según se indique, en presencia de CNTF (20–40 µg) (Prepotech Ltd), PACAP (100 nM) (Sigma) o BDNF (50 µg/ml) (Prepotech Ltd).

En el caso de los cultivos primarios de ratón (E16), las células se sembraron en placas de 35 ó 60 mm (4 x 10⁴ células/cm²) y se incubaron a 37 °C en medio definido suplementado con bFGF (10 ng/ml). Transcurridas 24 horas, el medio se sustituyó por medio definido sin bFGF, y se añadió CNTF (50 ng/ml) o PACAP (100 nM). Las células se cultivaron en estas condiciones durante 48 horas, tras las cuales las placas se procesaron para inmunocitoquímica o inmunodetección por western blot.

3.3 Generación y cultivo de neuroesferas.

Para la generación de neuroesferas se utilizaron cortezas cerebrales de embriones de ratón de 18 días de gestación. El tejido se disgregó mecánicamente en DMEM libre de suero y se filtró a través de un tamiz de Nylon de 40 µm (BD Bioscience). Tras su centrifugación, las células obtenidas se resuspendieron en DMEM que contenía tripsina (0,25%), EDTA 0,1 mM (Gibco), 1 µg/ml de hialuronidasa (Sigma) y 30 µg/ml de ADNasa (Promega), y se incubaron durante una hora a 37 °C con agitación. Las células se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en sacarosa 0,9 M preparada en solución salina de Dulbecco tamponada con fosfato (DPBS, *Dulbecco's phosphate buffered saline*) (Gibco), se centrifugaron una vez más y se resuspendieron en DPBS que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 4%.

Finalmente, las células se resuspendieron en medio compuesto por DMEM y F12 en proporción 1:1 (Gibco), suplementado con B-27 (Gibco), para ser sembradas en placas multipocillo de 35 mm (BD Bioscience). A continuación, se añadió bFGF y el

factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal growth factor*) a una concentración final de 10 µg/ml cada uno. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO₂ y, a partir del segundo día, se añadieron diariamente 5 µg/ml de bFGF y EGF.

Tras 7 días, las neuroesferas generadas se sembraron sobre cristales de 10 mm de diámetro pretratados con poli-D-ornitina y depositados en placas multipocillo MW-24 (BD Bioscience), donde se mantuvieron 5 días en DMEM-F12 con 50 µg/ml de BDNF (Peprotech EC Ltd.) para inducir la diferenciación de neuronas.

Pasados 5 días, las neuroesferas se fijaron con paraformaldehído (4%) y se procesaron para inmunocitoquímica y posterior visualización por microscopía confocal.

3.4 Obtención del ADN complementario de *Dlx4* de rata.

El ADNc que codifica *Dlx4* se obtuvo mediante RT-PCR tomando como molde ARN aislado de cultivos celulares de células RH1.C4. Para su amplificación y posterior clonaje en el vector pcADN3 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

Dlx4F1Hind3-directo.....5'-CAAAGCTTCCTGTGGTCTGGCATCACCG-3'
Dlx4R3BamH1-reverso.....5'-CTGGATCCGCTGTAGTCATTGAAAAGGGGGAGG-3'

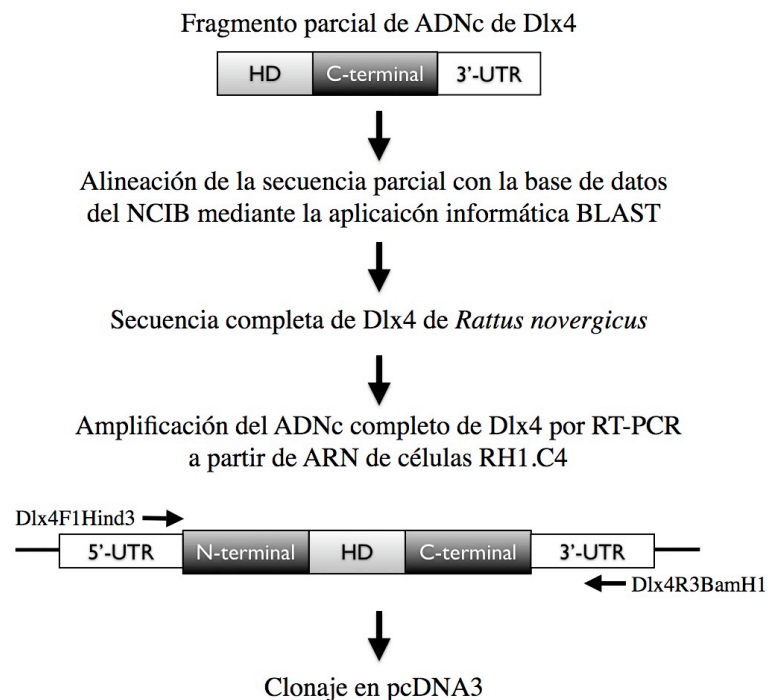


Figura 4. Esquema que representa el procedimiento llevado a cabo para el clonaje del ADNc de *Dlx4* de rata a partir de la secuencia parcial de la que se disponía.

El diseño de ambos cebadores se realizó a partir de la secuencia predicha para el ARNm del gen *Dlx4* de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), con número de acceso XM_220870. El oligonucleótido Dlx4F1Hind3 anilla en la región anterior al codón de inicio de la transcripción, entre los nucleótidos -22 y -2; y el oligonucleótido Dlx4R3BamH1 anilla en la región 3' sin traducir, entre los nucleótidos +928 y +953. Las condiciones de PCR fueron: 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95 °C durante 40 segundos, 56 °C durante 40 segundos y 72 °C durante 1 minuto. Tras finalizar el último ciclo, las muestras se mantuvieron durante 5 minutos a 72 °C. El producto resultante de aproximadamente 1 Kb se purificó y se incubó con las enzimas de restricción Hind3 y BamH1 para insertarlo en el plásmido de expresión pcADN3 (Figura 4). Una vez clonado, se secuenció para comprobar su identidad.

3.5 Plásmidos.

3.5.1 Vectores de expresión.

pcADN3-Dlx4: Vector de expresión eucariota pcADN3 (Invitrogen) que contiene clonado el ADN complementario del gen *Dlx4* de rata bajo el control del promotor temprano del citomegalovirus humano (CMV). Generado en nuestro laboratorio como se ha detallado con anterioridad.

pGEX-GST-Dlx4ΔN: Vector de expresión procariota que codifica una proteína quimérica compuesta por un fragmento de la proteína glutatión-S-transferasa (GST) fusionado al polipéptido de 64 aminoácidos correspondiente al extremo carboxilo-terminal de *Dlx4*. La proteína quimérica GST-Dlx4ΔN se utilizó como antígeno para la obtención de un antisuero policlonal de conejo anti-Dlx4.

3.5.2 Vectores reporteros.

GFAP-A7Luc: Incorpora una región del promotor del gen *gfap* de rata que controla la expresión del gen testigo luciferasa (Krohn et al., 1999). Esta construcción se encuentra clonada en el vector pGL2 y contiene la región del promotor del gen *gfap* que comprende desde el nucleótido -1546 hasta el +13. Donado por la Dra. Irina Rozovsky (Universidad de California del Sur, Los Ángeles, EE.UU.).

pRL-TK: Plásmido comercial que incorpora el gen reportero luciferasa del organismo *Renilla reniformis* sometido al control del promotor del gen timidina quinasa del virus Herpes simple (Promega).

3.6 Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).

Los ensayos de movilidad electroforética se realizaron con extractos nucleares de cultivos primarios (Schreiber et al, 1989) en presencia de los inhibidores de proteasas pepstatina A (1mg/ml), leupeptina (10 mg/ml) y p-aminobenzamidina (0,1 mM), o con la proteína Dlx4 traducida en un sistema de reticulocitos TnT7 (Promega) a partir de pcADN3-Dlx4.

Los oligonucleótidos de doble cadena nucleotídica fueron marcados con α - 32 P-dATP (10.000-20000 cpm) en una reacción con la polimerasa Klenow. Sus secuencias son las siguientes:

GFAP-T1.....5'-GATCCATAGACATAATGGTCAGGA-3'
GFAP-T2.....5'-GATCCGAGAGTGTAATTTAGGCTA-3'
GFAP-T3.....5'-GATCCTTTGCCAATTAGTGTGACA-3'

Las incubaciones para la interacción se llevaron a cabo en 20 μ l de una solución de tamponamiento compuesto por HEPES 50 mM, EDTA 1 mM y DTT 5 mM a temperatura ambiente durante 30 minutos y en presencia de 2 μ g de poli-(dI-dC), KCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,3 mM y glicerol al 10%.

En los casos en los que se quería comprobar la existencia de interacción de Dlx4 se utilizó 1 μ l del anticuerpo α -Dlx4 incubado a 37 °C durante 15 minutos antes de añadir la sonda radiomarcada.

En caso necesario se añadieron oligonucleótidos competidores sin marcar en un exceso que correspondía a 100 veces la concentración molar de la sonda.

3.7 Western inmunoblot.

Se prepararon extractos celulares de cultivos primarios de células de la corteza cerebral fetal de rata de 17 días de gestación (E17) o de ratón de 16 días de gestación

(E16), y extractos tisulares de cerebro de ratones de diferentes edades de edad postnatal (P0, P1, P3, P7 y P20) para los diferentes ensayos. En ambos casos se prepararon mediante ultrasonido en un buffer de lisis compuesto por HEPES 50 mM (pH 7,4), $\text{Na}_4\text{O}_7\text{P}_2$ 10 mM, NaF 100 mM, EDTA 2 mM, Na_3VO_4 2 mM, tritón X-100 (1%), glicerol (10%) y los inhibidores de proteasas PMSF 2 mM, aprotinina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y leupeptina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La concentración total de proteína se calculó mediante ensayo de Bradford frente a un patrón de BSA.

Las proteínas (10 ó 20 μg) se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) con SDS (0,1%) (SDS-PAGE), y utilizando una corriente de 160 V. Posteriormente fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante una corriente de 300 mA durante 1 hora.

La presencia de Dlx4 se detectó utilizando un anti-suero policlonal de conejo (1:10.000) generado en nuestro laboratorio, seguido de la incubación de un anticuerpo caprino anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:5.000) (Jackson Laboratorios). La banda inmunoreactiva se visualizó con un sistema de quimioluminiscencia comercial ECL (GE Healthcare) y autoradiografía.

La inmunoreactividad de GFAP se detectó con un anticuerpo monoclonal específico (dilución 1:10.000; clon G-A-5, Sigma), seguido de la incubación con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa y generado en caballo (dilución 1:5000, Biorad). Las bandas inmunoreactivas se visualizaron mediante el sistema ECL y posterior autoradiografía. Las membranas utilizadas para la detección de GFAP y Dlx4 se incubaron 20 minutos a 60 °C en solución de lavado (Tris-HCl 70mM pH 6.8, SDS al 10% y β -mercaptoetanol al 0,7%), y posteriormente, se procesaron con un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (dilución 1:20.000, Sigma) utilizado como monitorización del control de carga.

Las películas autoradiográficas se digitalizaron para realizar densitometrías de las bandas inmunoreactivas, tal como se describe en el apartado 10.

3.8 Inmunocitoquímica.

Los estudios inmunocitoquímicos se realizaron con cultivos primarios de células de corteza cerebral de embriones de ratón de 16 días de gestación, cultivos de neuroesferas preparadas a partir de la corteza cerebral de ratón 18 días de gestación y

cultivos primarios de células de la corteza cerebral de embriones de rata de 17 días de gestación.

El estudio inmunocitoquímico de cultivos primarios de células de la corteza cerebral embrionaria de ratón se llevó a cabo con diaminobencidina (DAB). Las células, se fijaron con una solución de paraformaldehído (4%) en PBS (pH 7,4) durante 5 minutos, tras los cuales, las células se lavaron tres veces con PBS/tritón X-100 (0,2 %) durante 10 minutos cada vez. Posteriormente, las células se permeabilizaron con metanol frío (-20 °C) durante 2 minutos y se incubaron durante 30 minutos en una solución de bloqueo compuesta por PBS/tritón X-100 (0,2 %) y suero normal de caballo a una concentración del 5 %.

Tras el bloqueo, los cultivos celulares se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-GFAP (clone G-A-5; Sigma) diluido 1:500 en PBS/tritón durante 16-20 horas a 4 °C.

Una vez retirado el anticuerpo primario, las células se lavaron 3 veces con PBS/tritón (3 minutos cada vez) y, a continuación, se bloqueó la peroxidasa endógena durante 30 minutos con una solución de H₂O₂ al 0,3% en PBS/tritón X-100. Las células se lavaron nuevamente, 3 veces durante 3 minutos cada vez, antes de incubarlas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado diluido 1:500 en PBS/tritón X-100 (Vector Labs).

Transcurrida una hora, las células se lavaron 3 veces con PBS sin tritón X-100 y, posteriormente, se incubaron en una solución del complejo ABC (VectastainElite Kit) en las proporciones descritas por el fabricante (Vector Labs), durante 45 minutos a temperatura ambiente.

La inmunodetección celular se realizó mediante incubación con una solución de DAB (Vector Labs) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras un lavado con H₂O, las muestras se secaron y se montaron con Glicergel (Dako) para ser visualizadas en un microscopio Nikon Eclipse E400 de luz transmitida con la aplicación informática de captura de imagen digital DP Controller y cámara digital Olympus DP50.

Para los estudios de inmunocitoquímica por fluorescencia, se utilizaron cultivos de neuroesferas de corteza cerebral embrionaria de ratón de 18 días de gestación y cultivos primarios de células de la corteza cerebral de embriones de rata de 17 días de gestación, ambos, en las condiciones de cultivo y tratamiento descritas en el apartado de cultivos celulares.

Los procesos de fijación, lavado, permeabilizado, bloqueo con suero normal de cabra o caballo, y la incubación del anticuerpo primario son idénticos a los descritos para la inmunocitoquímica por DAB. Los anticuerpos primarios utilizados para esta metodología fueron los siguientes:

Anticuerpo	Dilución	Fuente	Especie	Tipo
α -GFAP	1:500	Sigma	Ratón	Monoclonal
α -S100 β	1:500	Sigma	Ratón	Monoclonal
α -Tuj-1	1:500	Sigma	Ratón	Monoclonal
α -Nestina	1:4000	Propio	Conejo	Policlonal
α -Nestina (RAT-401)	1:200	Banco de Híbridomas (Universidad de Iowa, EEUU)	Ratón	Monoclonal
α -Dlx4	1:400	Propio	Conejo	Policlonal

Tras la incubación del anticuerpo primario, los cultivos celulares se lavaron 3 veces, (3 minutos cada vez) con PBS/tritón previo paso a su incubación, durante 45 minutos a temperatura ambiente, con los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos. En función del anticuerpo primario se utilizaron los siguientes anticuerpos conjugados:

Anticuerpo Secundario	Dilución	Fuente	Especie	Fluorocromo
Anti-ratón	1:500	Molecular Probes	Cabra	Alexa 488 (emisión verde)
Anti-ratón	1:500	Molecular Probes	Cabra	Alexa 546 (emisión roja)
Anti-conejo	1:500	Molecular Probes	Cabra	Alexa 488 (emisión verde)
Anti-conejo	1:500	Molecular Probes	Cabra	Alexa 546 (emisión roja)

Para la observación de los núcleos celulares se utilizó Hoechst 3342 (Invitrogen) a una dilución 1:1000 en el mismo periodo de incubación de los anticuerpos secundarios.

Para la observación y adquisición de las imágenes de neuroesferas de ratón se usó un microscopio confocal espectral Leica TCS SP5. Para las imágenes correspondientes

a la diferenciación de los cultivos primarios de células de la corteza cerebral de rata por BDNF, se utilizó un microscopio de luz transmitida y epifluorescencia Nikon 90i equipado con cámara digital y la aplicación informática NIS Elements v. 2.43 (Nikon).

3.9 Inmunohistoquímica.

Los embriones de rata y los cerebros de ratón se fijaron con una solución de paraformaldehído (4%) en PBS durante 16-20 horas a 4°C, tras lo cual se lavaron 2 veces con PBS y se conservaron hasta su utilización en sacarosa (20%) a 4 °C.

Para la obtención de las crio secciones, se embebieron en resina TissueTek OCT (Sakura) a -20 °C hasta su congelación, tras lo cual las muestras se procesaron en un crioestato Leica Cryocut 1900 para generar secciones de 16 ó 20 μm de grosor. Las secciones se montaron y se conservaron a -20 °C en portaobjetos de cristal tratados previamente con gelatina.

3.9.1 Inmunodetección de Dlx4.

La detección de la proteína Dlx4 se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia en cortes histológicos de embriones completos de rata de 14, 15 y 17 días de gestación.

Los cortes histológicos obtenidos se lavaron 3 veces (10 minutos cada vez) con PBS-tritón (0,2%) para eliminar los restos de resina TissueTek OCT y, a continuación, se permeabilizaron con metanol frío (-20 °C) durante 5 minutos. Una vez permeabilizadas, las secciones se incubaron durante 30 minutos en solución de bloqueo con suero normal de cabra (5%) y suero normal de caballo (5%) en PBS/tritón.

Terminado el bloqueo, las secciones se incubaron en presencia de un anticuerpo específico que reconoce el marcador neuronal Tuj-1 (dilución 1:500, Sigma) y un antisuero de conejo que reconoce la región carboxilo terminal de la proteína Dlx4 (dilución 1:400) y que fue generado en nuestro laboratorio.

Posteriormente, tras varios lavados con PBS/tritón, las secciones se incubaron en solución PBS/tritón que contenía los siguiente anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos:

Anticuerpo Secundario	Dilución	Fuente	Especie	Fluorocromo
Anti-ratón	1:500	Molecular Probes	Cabra	Alexa 488 (emisión verde)
Anti-ratón	1:500	Molecular Probes	Cabra	Alexa 546 (emisión roja)
Anti-conejo	1:500	Molecular Probes	Cabra	Alexa 488 (emisión verde)
Anti-conejo	1:500	Molecular Probes	Cabra	Alexa 546 (emisión roja)
Anti-cabra	1:500	Molecular Probes	Burro	Alexa 546 (emisión roja)

Para la observación de los núcleos celulares se utilizó 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma) a una dilución 1:1.000 en el mismo periodo de incubación de los anticuerpos secundarios.

Para la observación y adquisición de las imágenes de las secciones se usaron dos microscopios confocales espectrales Leica TCS SP2 y SP5, y un microscopio confocal Zeiss LSM510 META.

3.9.2 Inmunodetección de los marcadores astrocitarios GFAP y S100 β , y del marcador neuronal NeuN en ratones *dream*^{+/+} y *dream*^{-/-}.

Para este tipo de ensayos se han utilizado cortes histológicos del cerebro de ratones *dream*^{+/+} y *dream*^{-/-} de 1 y 7 días, o de 12 semanas de edad.

Los protocolos utilizados para la inmunodetección mediante DAB y fluorescencia en estos ensayos son idénticos a los descritos en los apartados anteriores.

Para la detección de los marcadores astrocitarios GFAP y S100 β , las secciones obtenidas se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-GFAP (dilución 1:500, clon G-A-5; Sigma) en PBS/tritón X-100, o con el anticuerpo monoclonal α -S100 β (dilución 1:500, Sigma) durante 16-20 horas a 4 °C. Los núcleos se detectaron, en el caso de inmunofluorescencia, con el marcador nuclear TO-PRO3 (dilución 1:500, Invitrogen) conjugado con Alexa 633.

Para la detección del marcador neuronal NeuN, las secciones se incubaron con el anticuerpo monoclonal α -NeuN (dilución 1:100, Sigma) y se procesaron para inmunohistoquímica mediante el sistema DAB.

Para la observación y adquisición de las imágenes se usó un microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 en el caso del sistema de inmunodetección por fluorescencia, o un microscopio Nikon Eclipse E400 de luz transmitida con la aplicación informática de captura de imagen digital DP Controller y cámara digital Olympus DP50.

3.10 Análisis de imágenes.

Todas las imágenes captadas se han tratado mediante la aplicación informática Photoshop CS2 (versión Macintosh, Adobe) para su análisis y visualización.

Para la determinación densitométrica de los niveles de expresión relativos de GFAP, las películas autoradiográficas se digitalizaron con un escáner Perfection 1200 (Epson). La imagen digital se cuantificó mediante la aplicación informática NIH ImageJ (versión 1.37b, National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)

La cuantificación del número de células en imágenes de las preparaciones inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas se realizó con la aplicación informática de análisis de imagen AnalySIS (Soft Imaging Systems GmbH). En todos los casos, los datos se representan en forma de media aritmética con el error típico y su correspondiente análisis estadístico mediante el test de la t de Student.

En el caso particular de las neuroesferas, la cuantificación del número de células se realizó con el complemento “*Cell counter*” (Kurt De Vos, Universidad de Sheffield, *Academic Neurology*) de la aplicación informática ImageJ. La cuantificación del número de neuronas se llevó a cabo en la corona de células dispuesta alrededor de la neuroesfera y se representa como porcentaje de células positivas para el marcador Tuj frente al número total de células marcadas con Hoescht 33342 (Molecular Probes). Los datos de 17-20 neuroesferas de tres experimentos independientes se representan en forma de media aritmética con el error típico. Para comprobar el nivel de significación de los resultados se realizó un análisis estadístico mediante el test de la t de Student.

3.11 Transfecciones.

Las transfecciones se realizaron como se describe por Cebolla y Vallejo (2006). Los cultivos primarios de células de la corteza cerebral de embriones de rata de 17 días de gestación en expansión se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 minutos con 4 ml de HBSS a 37 °C. Posteriormente, las células se desprendieron mecánicamente con una pipeta de precisión de 1 ml y se centrifugaron a 1000 rpm. Las células fueron resuspendidas y sembradas a una densidad de 10^6 células/placa y mantenidas en medio definido con bFGF (10 ng/ml) durante 24 horas. En todos los casos el medio se sustituyó con 4 ml de medio definido sin bFGF que contenía 10 μ l de FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche), 6 μ g de plásmido testigo, 0.5 μ g de plásmido pRL-TK (Promega) y 0.3, 1 ó 3 μ g del vector de expresión pcADN3-Dlx4.

Transcurridas 4 horas de incubación, el medio con la mezcla de transfección se sustituyó por 3 ml de medio definido con CNTF (20 ng/ml) o PACAP (100 nM). La actividad luciferasa se determinó 48 horas tras la transfección mediante el sistema Dual Luciferase Assay (Promega). Los resultados de cada experimento se normalizaron con la actividad luciferasa de una transfección independiente del plásmido RSV-Luc, y la eficiencia de transfección fue corregida con la actividad renilla.

Los datos obtenidos se representan en forma de media aritmética y error típico de al menos tres experimentos llevados a cabo por duplicado.

Resultados

RESULTADOS.

4.1 Implicación de DREAM en la astrogénesis y en la sincronización de la transición entre neurogénesis y astrogénesis.

4.1.1 DREAM es necesario para la expresión de GFAP inducida por PACAP en precursores corticales.

Un primer objetivo planteado en la presente tesis doctoral consistió en determinar si DREAM participa en el proceso de diferenciación de astrocitos *in vivo*. Para ello, utilizamos ratones mutantes en los que se ha eliminado el gen *dream* mediante recombinación homóloga (Cheng et al., 2002).

Inicialmente, evaluamos la capacidad de las células progenitoras de la corteza fetal para diferenciarse en astrocitos en respuesta a diversos estímulos en ausencia de DREAM. Para ello, utilizamos un sistema de cultivos primarios *in vitro* de uso habitual en nuestro laboratorio (McManus et al., 1999; Vallejo and Vallejo, 2002; Cebolla and Vallejo, 2006) que hemos caracterizado tanto en ratón como en rata. Estos cultivos están formados por células proliferativas indiferenciadas que expresan el marcador neural nestina, propio de precursores neurales, y son capaces de diferenciarse en astrocitos en respuesta al tratamiento con PACAP o CNTF (Figura 5).

Observamos que las células de los ratones *dream*^{-/-} conservan intacta su capacidad para diferenciarse en astrocitos, evidenciada por la formación de prolongaciones citoplasmáticas y la expresión de GFAP, en respuesta CNTF. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con las células preparadas a partir de los ratones control, las células carentes de DREAM no se diferencian en astrocitos en respuesta a PACAP (Figura 6).

La ausencia de GFAP en las células carentes de DREAM tratadas con PACAP se confirmó mediante western blot con extractos celulares de cultivos primarios en las mismas condiciones experimentales (Figura 7).

Por tanto, estos experimentos ponen de manifiesto que DREAM es indispensable para la expresión de GFAP inducida por PACAP en células precursoras de la corteza cerebral embrionaria.

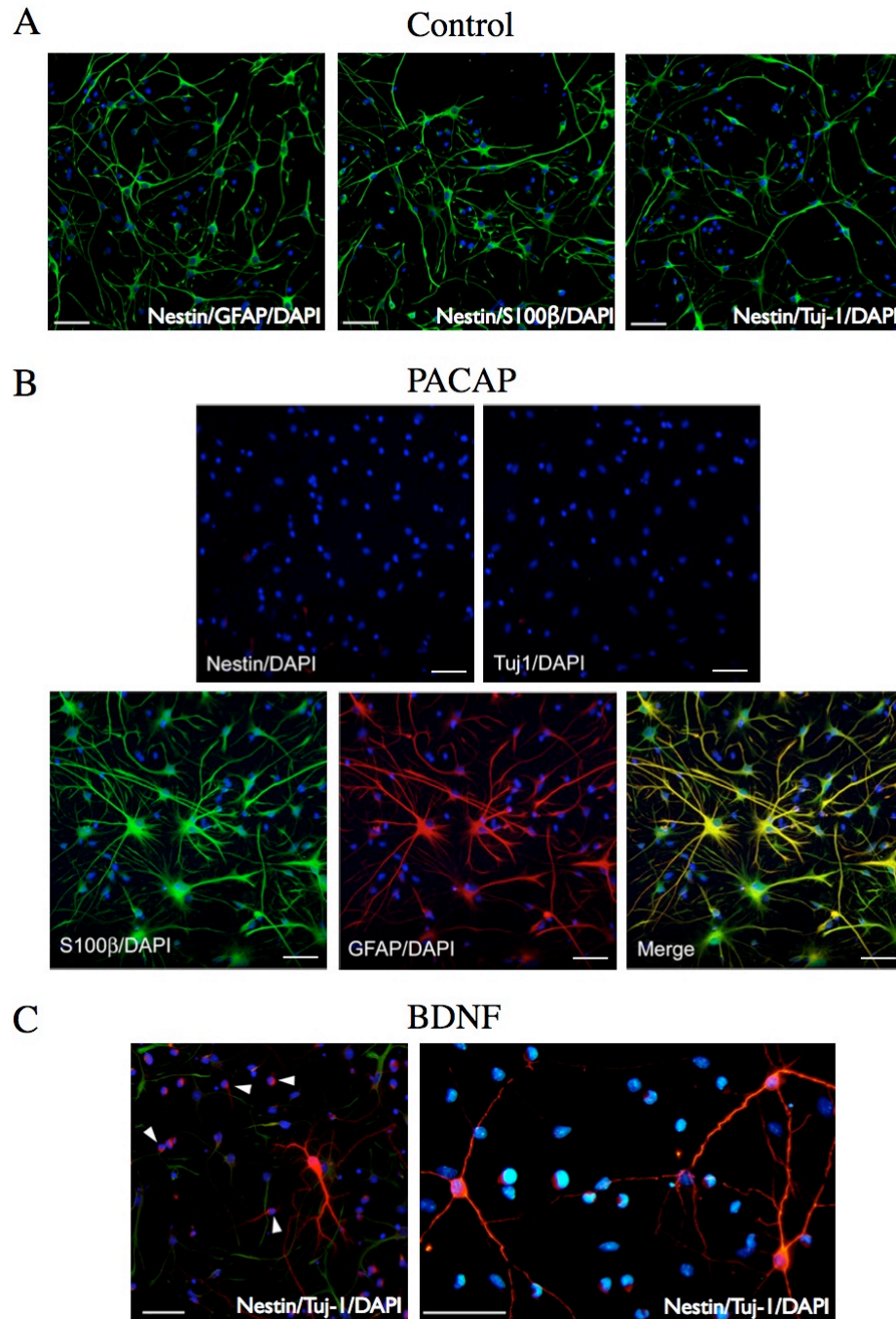


Figura 5. Caracterización de los cultivos primarios de células precursoras de la corteza cerebral de rata de 17 días de gestación mediante fluorescencia confocal. (A) Las células control que no han estado expuestas a PACAP expresan el marcador de precursor neural nestina (verde) pero no los marcadores astrogiales GFAP y S100β (rojo) ni el marcador neuronal Tuj-1 (rojo). **(B)** Las células expuestas a PACAP (100 nM) durante 5 días coexpresan los marcadores astrogiales GFAP (verde) y S100β (rojo), pero no nestina (verde) ni el marcador neuronal Tuj-1 (rojo). **(C)** Las células expuestas a BDNF (50 ng/ml) durante 5 días expresan el marcador neuronal Tuj-1 (rojo). Las puntas de flecha blancas muestran neuronas en formación. En todos los casos se realizó tinción nuclear con DAPI (azul).

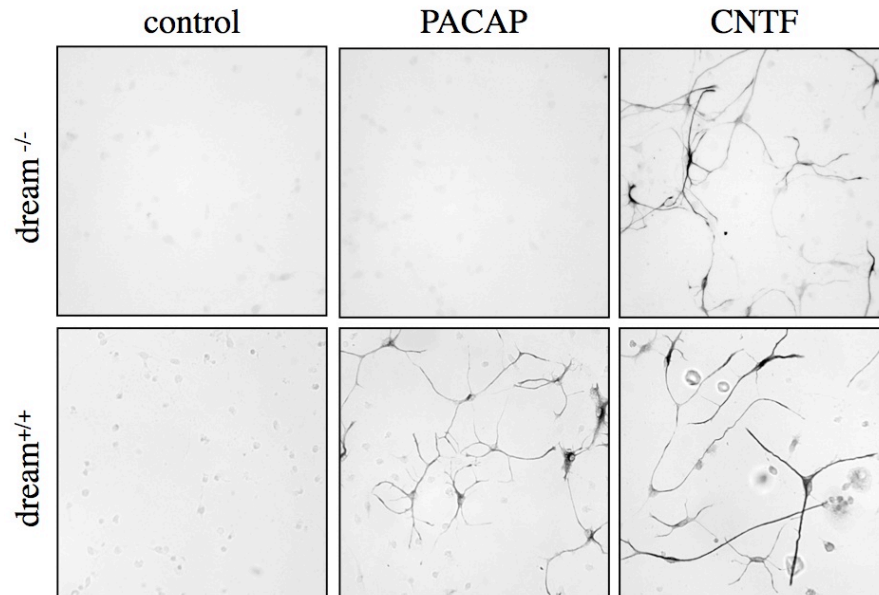


Figura 6. DREAM es necesario para la diferenciación de astrocitos inducida por PACAP en células precursoras corticales de embriones de ratón. Detección inmunocitoquímica de GFAP en cultivos primarios preparados a partir de cortezas cerebrales de fetos de 16 días de gestación y cultivados en medio definido en presencia de bFGF (control). Para inducir la diferenciación se retiró del medio el bFGF y las células fueron tratadas durante 2 días con PACAP (100 nM) o CNTF (50 ng/ml). No se detectó inmunoreactividad para GFAP en las células control sin tratar, o en células preparadas a partir de ratones deficientes en DREAM tratadas con PACAP.

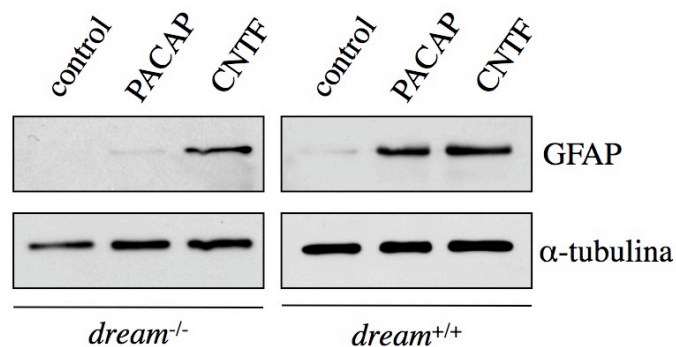


Figura 7. DREAM es necesario para la expresión de GFAP inducida por PACAP en células precursoras corticales de embriones de ratón. Western immunoblots que muestran la expresión de GFAP en extractos celulares de cultivos primarios corticales de fetos de ratón de 16 días de gestación tratados bajo las mismas condiciones que los de la figura 5. Nótese que GFAP no es detectable en las células tratadas con PACAP y preparadas a partir de ratones carentes de DREAM. La detección de α -tubulina se utilizó como control de carga de las muestras.

4.1.2 DREAM participa en la regulación de la generación de astrocitos *in vivo*.

Los trabajos anteriores de nuestro grupo demuestran que PACAP actúa como una señal neurotrófica capaz de regular la astrogénesis a partir de células progenitoras fetales *in vitro* (Vallejo and Vallejo, 2002; Cebolla and Vallejo, 2006). Así mismo, hemos demostrado que DREAM actúa como efector de PACAP y es esencial para la diferenciación de astrocitos en cultivos de precursores corticales. Estos datos nos permitieron postular que, en ratones carentes del gen que codifica DREAM, la astrogénesis pudiera encontrarse comprometida.

Para evaluar esta hipótesis medimos los niveles proteicos de GFAP en edades durante las cuales el proceso de astrogliogénesis se encuentra activo. Para ello llevamos a cabo ensayos de western immunoblot con extractos celulares obtenidos de cortezas cerebrales de ratones *dream*^{+/+} y *dream*^{-/-} de uno y tres días de edad postnatal (P1 y P3). Los western blots muestran que en el primer día de vida los ratones carentes del gen *dream* tienen disminuidos los niveles de GFAP en comparación con los ratones control (Figura 8A). De hecho, la cuantificación por densitometría de las bandas inmunoreactivas reflejan una reducción de más del 50% en los niveles proteicos de GFAP en los ratones *dream*^{-/-} respecto a los ratones *dream*^{+/+} (Figura 8B).

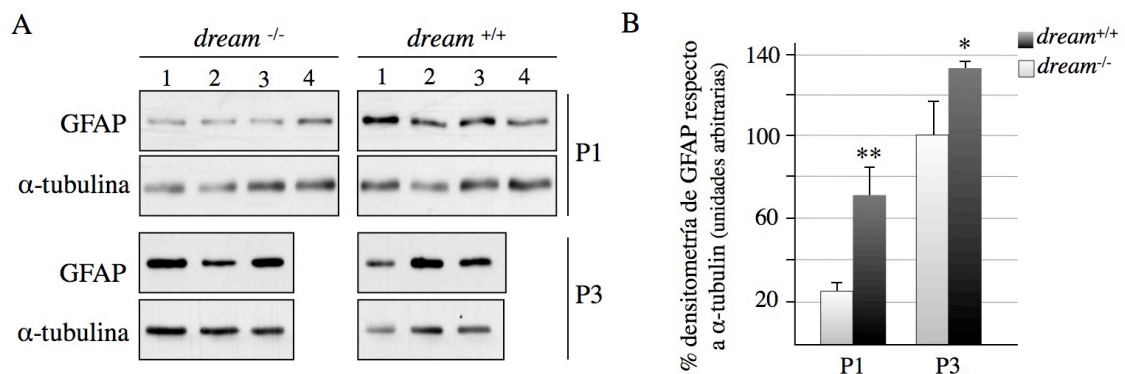


Figura 8. Los ratones carentes de DREAM presentan una reducción en la expresión de GFAP en la corteza cerebral durante al inicio del periodo postnatal (A) Western immunoblot que muestra la expresión de GFAP en extractos de cortezas cerebrales aisladas de ratones de uno y tres días de edad postnatal (P1 y P3 respectivamente) deficientes en DREAM (*dream*^{-/-}) o ratones silvestres (*dream*^{+/+}). Los números en la parte superior del panel indican el ratón del cual procede la muestra. La detección de α -tubulina se utilizó como control de carga de las muestras. **(B)** Análisis densitométrico llevado a cabo para cuantificar la intensidad relativa de las bandas inmunoreactivas de GFAP detectadas por western blot. Los resultados se expresan como porcentaje del incremento de las medidas densitométricas de las bandas de GFAP (en unidades arbitrarias) relativas a la intensidad de su correspondiente banda de α -tubulina. ** $p < 0,02$; * $p < 0,05$ (Test de la *t* de Student).

A los tres días de edad, observamos que los animales deficientes en DREAM continúan teniendo niveles de GFAP significativamente menores que los encontrados en ratones control, aunque la diferencia entre ambos grupos es menor que la observada en animales de un día de vida (Figura 8B).

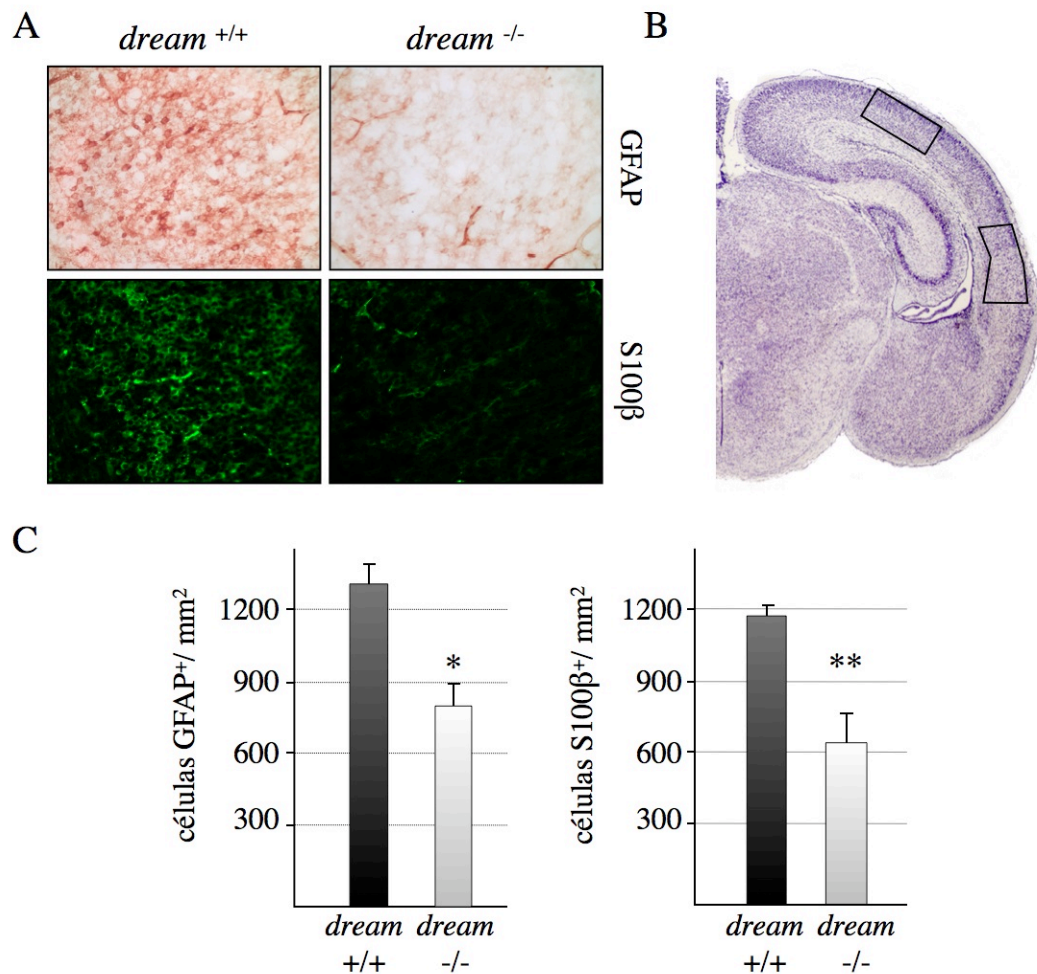


Figura 9 . Los ratones carentes de DREAM presentan un menor número de astrocitos en la corteza cerebral durante al inicio del periodo postnatal. (A) Ejemplos representativos de secciones de corteza cerebral dorsal de ratones de un día de edad postnatal de tipo silvestre (*dream*^{+/+}) o carentes de DREAM (*dream*^{-/-}) procesadas mediante inmunodetección con el sistema peroxidasa/DAB o inmunofluorescencia para la detección de GFAP y S100β, respectivamente. (B) Sección coronal de cerebro de ratón de un día de edad postnatal teñida con violeta de cresilo donde se muestran recuadradas las regiones dorsal y lateral de la corteza cerebral utilizadas para determinar el número de astrocitos tras el ensayo inmunohistoquímico. Se contaron células de regiones simétricas a ambos lados. (C) Comparativa de la expresión detectados por la expresión de GFAP y S100β, encontrados en la corteza cerebral de ratones postnatales P1 y P3 deficientes en DREAM y ratones silvestres control. **p*<0,002 y ***p*<0.002 (Test de la *t* de Student). Escala, 50 μm.

Para dilucidar si las diferencias en los niveles proteicos de GFAP detectadas tras el nacimiento de los ratones se deben a la existencia de un defecto primario en la expresión del gen *gfap* o a una alteración en la diferenciación de astrocitos llevamos a cabo estudios de inmunohistoquímica en secciones de cerebro para detectar la presencia de GFAP y S100 β , dos marcadores característicos de estas células.

La inmunodetección de GFAP y S100 β en la corteza cerebral de secciones coronales de cerebros de ratones de un día de edad postnatal puso de manifiesto que los animales que carecen de DREAM presentan un menor número de astrocitos en comparación con los ratones silvestres (Figura 9A). En efecto, un análisis cuantitativo realizado mediante la determinación del número de células positivas para GFAP y S100 β en la corteza cerebral, indica un descenso en torno al 40% en el número de astrocitos (Figura 9C).

Estos datos demuestran que el descenso en los niveles de GFAP en ratones carentes de DREAM se debe a un defecto primario en la diferenciación astrocitaria y no solo a un defecto primario en la expresión del gen *gfap*.

A continuación quisimos comprobar si esta anomalía en el número de astrocitos corresponde a un efecto local, restringido a la corteza cerebral, o si por el contrario se trata de un efecto generalizado. Mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-GFAP comprobamos que otras áreas del cerebro de ratones de un día de edad postnatal carentes de DREAM también presentan deficiencias en el número de astrocitos.

Así, por ejemplo, en la figura 10A se puede observar un número menor de astrocitos en el *septum* y en el cuerpo calloso de los cerebros de ratones deficientes en DREAM.

Todos estos datos indican que la generación de astrocitos en ratones carentes del gen *dream* es defectuosa, reflejando la importancia de DREAM para la astrogliogénesis durante el desarrollo de la corteza cerebral.

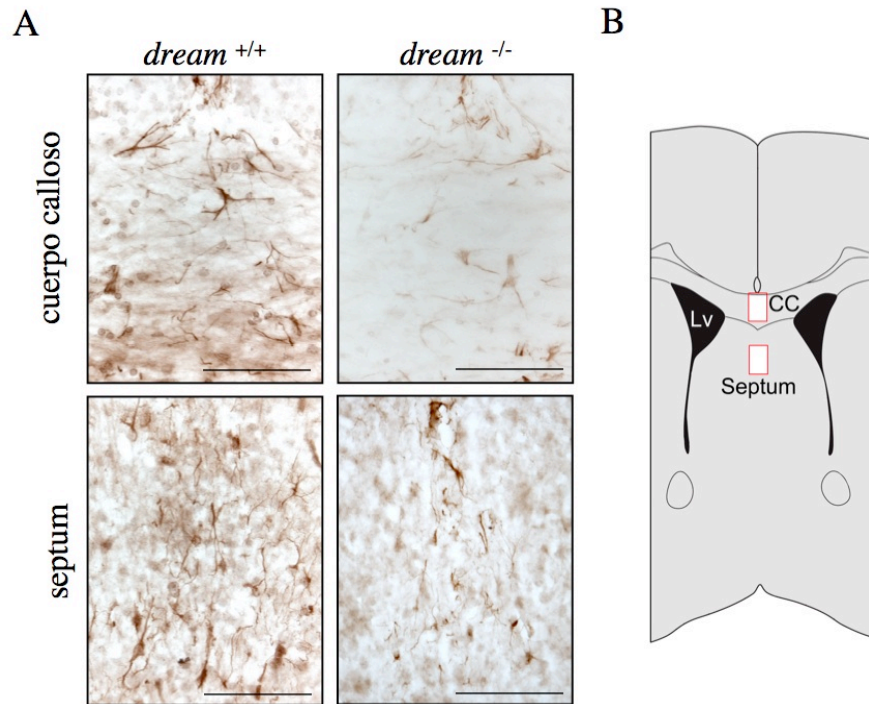


Figura 10. Reducción del número de astrocitos en el cuerpo calloso y septum de ratones deficientes en DREAM. (A) Secciones coronales del cerebro que muestran ejemplos representativos del cuerpo calloso y del septum de ratones de un día de edad postnatal carentes de DREAM (*dream*^{-/-}) o ratones silvestres (*dream*^{+/+}), procesados mediante inmunohistoquímica con peroxidasa/DAB para GFAP. (B) Dibujo esquemático de la porción media de una sección coronal de un cerebro de ratón donde se indica mediante un rectángulo rojo la localización aproximada de los campos mostrados. CC: cuerpo calloso; Lv: ventrículo lateral. Escala, 100 μ m.

4.1.3 La transición de neurogénesis a astrogénesis está alterada en ausencia de DREAM.

Está ampliamente demostrado que la astrogénesis solo tiene lugar una vez que la neurogénesis ha finalizado y que existen señales progliogénicas que, de forma coordinada, inhiben los procesos neurogénicos (Miller and Gauthier, 2007). Por tanto, si la disminución en el número de astrocitos detectado tras el nacimiento corresponde a un aparente retraso en el inicio de la astrogénesis acompañado de un retraso en la inhibición de la neurogénesis, ello tendría como consecuencia un aumento en el número de neuronas. Para comprobar esta hipótesis analizamos el número de neuronas corticales en secciones coronales de cerebro de ratones *dream*^{-/-} y *dream*^{+/+} de un día de edad postnatal. Comprobamos que la cortezas cerebrales de los ratones carentes de DREAM presentan un incremento del 20% en el número de células inmunoreactivas para el marcador neuronal NeuN (Figuras 11A y 11B).

Este aumento en el número de neuronas va acompañado de una alteración en la organización celular de la corteza cerebral, según la cual la distribución de las neuronas en la corteza de los ratones *dream*^{-/-} es más uniforme (Figura 11A). Cuando realizamos un análisis similar en ratones de 7 días de edad postnatal encontramos un aumento de aproximadamente un 18% en el número de neuronas en ausencia de DREAM (Figuras 11C y 11D). Por tanto, estas observaciones indican que este efecto persiste en el tiempo más allá de la finalización de la neurogénesis.

Una posible explicación para esta observación es que, aparte de su implicación en los mecanismos que promueven astrogliogénesis en respuesta a señales específicas, DREAM podría participar coordinadamente en los mecanismos restrictivos que se oponen a la generación de neuronas al final del período neurogénico. Por lo tanto, si DREAM regula la generación de neuronas negativamente, cabría esperar que los precursores neurales deficientes en DREAM mostraran una mayor capacidad para generar las neuronas.

Con el propósito de comprobar si esta predicción era correcta, analizamos el número de neuronas generadas a partir de precursores neurales cultivados en forma de neuroesferas en presencia de BDNF. Observamos que las neuroesferas preparadas a partir de ratones deficientes en DREAM generan un número de neuronas que excede en un 40% a las generadas por las neuroesferas obtenidas a partir de ratones control (Figura 12).

Estos resultados avalan la hipótesis según la cual, DREAM, además de participar en la gliogénesis inducida por PACAP, formaría parte de los mecanismos represores de la neurogénesis.

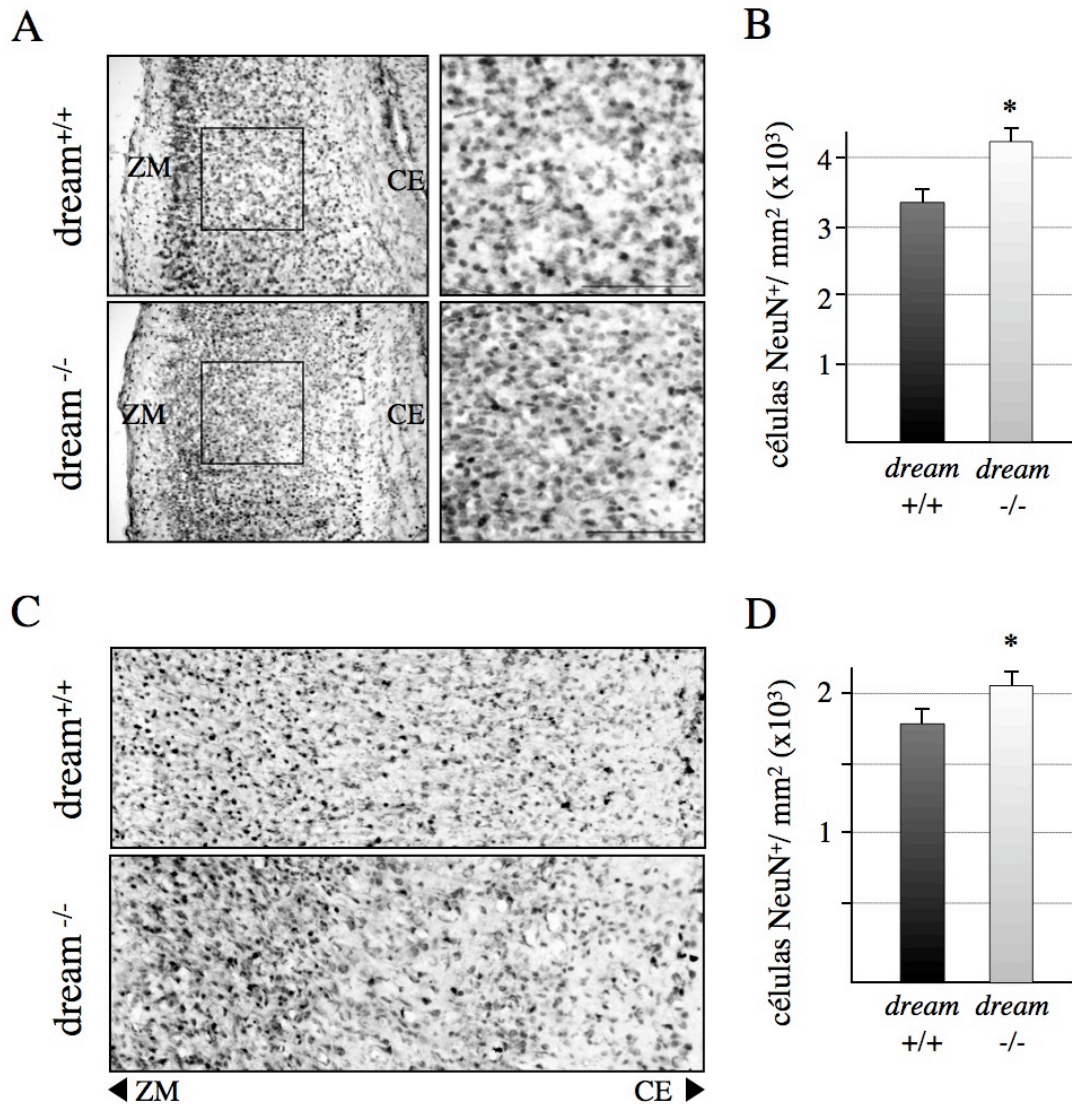


Figura 11. Los ratones deficientes en DREAM exhiben un incremento en el número de neuronas corticales. (A) Fotomicrografías que representan la región lateral de una sección coronal de cerebro de ratón de un día de edad postnatal similar a la mostrada en la figura 9. Las secciones de ratones silvestres (*dream*^{+/+}) o deficientes en DREAM (*dream*^{-/-}) fueron procesadas para la detección inmunohistoquímica de NeuN. Los paneles laterales muestran imágenes magnificadas que corresponden a la áreas indicadas por un rectángulo. Escala, 100 μ m. (B) Comparación del número de neuronas, detectadas por al expresión de NeuN, en la corteza cerebral de ratones de un día postnatal de tipo silvestre o deficientes en DREAM. * $p < 0,005$ (Test de la *t* de Student). (C) Fotomicrografías que representa la región lateral de una sección coronal de cerebro de ratón de 7 día de edad postnatal similar a la mostrada en la figura 9. Las secciones de ratones silvestres (panel superior) o deficientes en DREAM (panel inferior) fueron procesadas para la detección inmunohistoquímica de NeuN. (D) Comparación del número de neuronas, detectadas por al expresión de NeuN, encontradas en la corteza cerebral de ratones de siete días de edad postnatal de tipo silvestre o deficientes en DREAM. * $p < 0,03$ (Test de la *t* de Student). CE: cápsula externa; ZM: zona marginal.

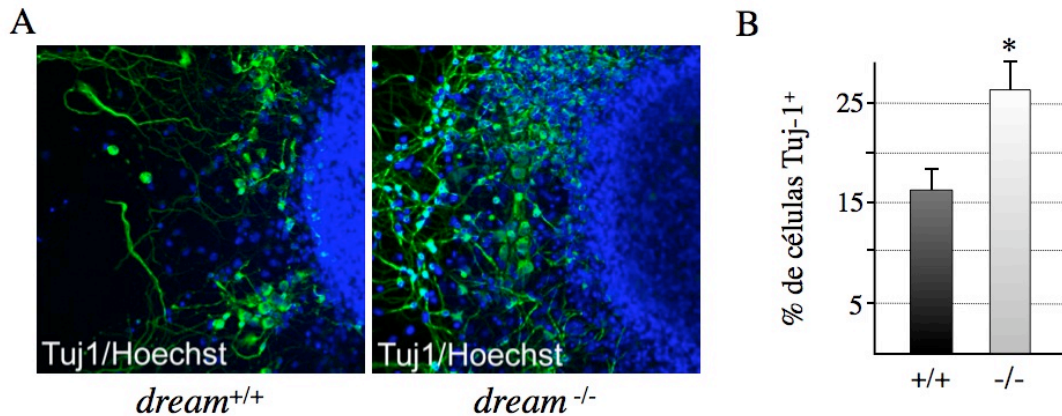


Figura 12. Aumento de la capacidad de diferenciación neuronal mostrada por los precursores corticales de embriones de ratón carentes de DREAM. (A) Inmunoreactividad de Tuj-1 (verde) detectada en cultivos de neuroesferas tratados con BDNF (50 ng/ml) obtenidos a partir de ratones control (panel izquierdo) o carentes de DREAM (panel derecho). El color azul indica núcleos celulares teñidos con Hoescht. (B) Cuantificación del número de neuronas, detectadas por la expresión de Tuj-1, encontradas cultivos de neuroesferas similares a las mostradas en el panel A. * $p < 0,005$ (Test de la *t* de Student).

El observado incremento en el número de neuronas producidas en el cerebro de los ratones carentes de DREAM podría, a su vez, tener un efecto secundario sobre el número de astrocitos producidos más tardíamente. Esta idea se basa en estudios realizados por Barnabé-Heider y cols. (2005), según los cuales, tras su diferenciación, las neuronas corticales secretan citoquinas neurotróficas capaces de actuar sobre las células progenitoras para inducir su diferenciación en astrocitos. Habida cuenta que las células progenitoras de los ratones *dream*^{-/-} retienen intacta la capacidad de diferenciación en respuesta a citoquinas neurotróficas (véase figura 6), nos planteamos investigar si el número de astrocitos generados en estos ratones en estadios más tardíos pudiera estar alterado indirectamente por el exceso de neuronas.

Mediante western blot observamos que los niveles de GFAP en ratones de 7 días de edad postnatal carentes de DREAM son superiores a los encontrados en los ratones control de su misma edad (Figura 13A). La cuantificación por densitometría de las bandas inmunoreactivas demuestra que este incremento es aproximadamente de un 50% con respecto a los ratones *dream*^{+/+} (Figura 13B).

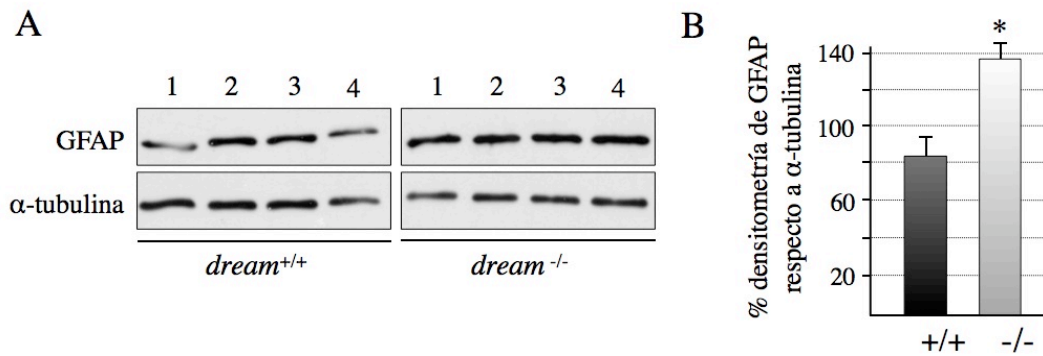


Figura 13. Los ratones carentes de DREAM presentan un incremento en la expresión de GFAP en periodos postnatales tardíos. (A) Western inmunoblot que muestra la expresión de GFAP en extractos de cortezas cerebrales aisladas de ratones de 7 días de edad postnatal deficientes en el gen DREAM (*dream*^{-/-}) o ratones silvestres control (*dream*^{+/+}). Los números en la parte superior del panel indican el ratón del cual procede la muestra. La detección de α-tubulina se utilizó como control de carga. (B) Análisis densitométrico llevado a cabo para cuantificar la intensidad relativa de las bandas inmunoreactivas de GFAP detectadas por western blot. Los resultados se expresan como porcentaje del incremento de las medidas densitométricas de las bandas de GFAP (en unidades arbitrarias) relativas a la intensidad de su correspondiente banda de α-tubulina. *p<0,02 (Test de la *t* de Student).

Para comprobar si este aumento en los niveles de GFAP corresponde a un aumento en el número de astrocitos, realizamos inmunohistoquímica en secciones coronales de cerebros de ratones de 7 días de edad postnatal. Efectivamente, las secciones procedentes de ratones deficientes en DREAM presentan un mayor número de células positivas para GFAP en distintas regiones del cerebro (Figura 14).

Para investigar si este incremento tiene carácter permanente, realizamos experimentos similares en ratones de 20 días y de 12 semanas de edad. Observamos que los niveles de expresión de GFAP en la corteza cerebral de ratones de 20 días de edad carentes de DREAM son notablemente superiores en comparación con los ratones control (Figura 15). En animales adultos de 12 semanas de edad, el estudio inmunohistoquímico en secciones histológicas de hipocampo mostró que los ratones *dream*^{-/-} presentan un incremento del 15% en el número de astrocitos con respecto a los ratones silvestres (Figura R16).

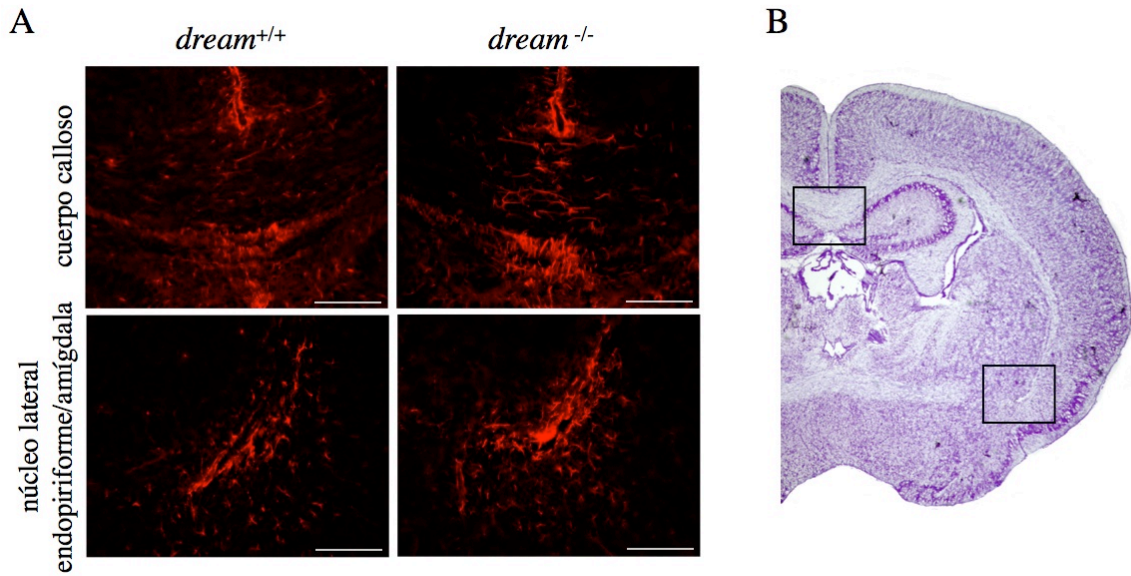


Figura 14. Los ratones carentes de DREAM presentan un incremento en el número de astrocitos durante el periodo postnatal tardío. (A) Sección coronal de cerebro de ratón de 7 días de edad postnatal teñida con violeta de cresilo donde se muestran recuadradas las regiones del núcleo endopiriforme y amígdala lateral (recuadro inferior), y el cuerpo calloso (recuadro superior) procesadas mediante inmunofluorescencia para detectar la expresión de GFAP. (B) Secciones coronales de cerebros de ratones de 7 días de edad postnatal teñidas con violeta de cresilo donde se muestran recuadradas las regiones del cuerpo calloso (paneles superiores) y la amígdala lateral junto al núcleo endopiriforme (paneles inferiores) utilizadas para comparar la población astrocitaria de ratones control y deficientes en DREAM. Escala, 100 μ m.

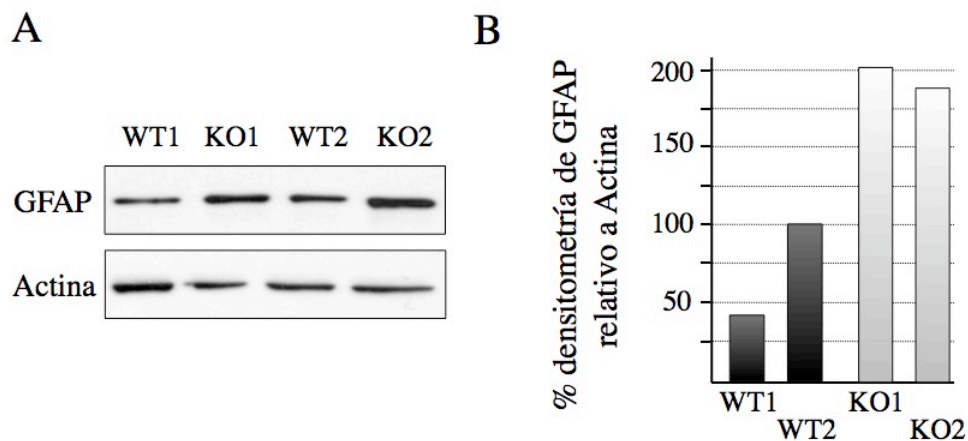


Figura 15. Aumento de la expresión de GFAP e la corteza cerebral de ratones adultos carentes de DREAM. (A) Western inmunoblot que muestra la expresión de GFAP en extractos de corteza cerebral de ratones de 20 días de edad postnatal deficientes en DREAM (KO) o ratones control (WT). Los números en la parte superior del panel indican el ratón del cual procede la muestra. La detección de actina se utilizó como control de carga de las muestras. (B) Análisis densitométrico llevado a cabo para cuantificar la intensidad relativa de las bandas inmunoreactivas de GFAP detectadas por western blot. Los resultados se expresan como porcentaje del incremento de la medida densitométrica de las bandas de GFAP (en unidades arbitrarias) relativas a la intensidad de su correspondiente banda de actina. Se representan los valores densitométricos individuales.

Todos estos resultados ponen de manifiesto que, en periodos postnatales tempranos, la carencia de DREAM tiene como consecuencia un aumento en el número de neuronas y un retraso en el inicio de la astrogliogénesis. En cambio, una vez iniciada la formación de astrocitos, se ponen en marcha mecanismos compensatorios que mantienen la proporción entre el número de neuronas y el número de astrocitos.

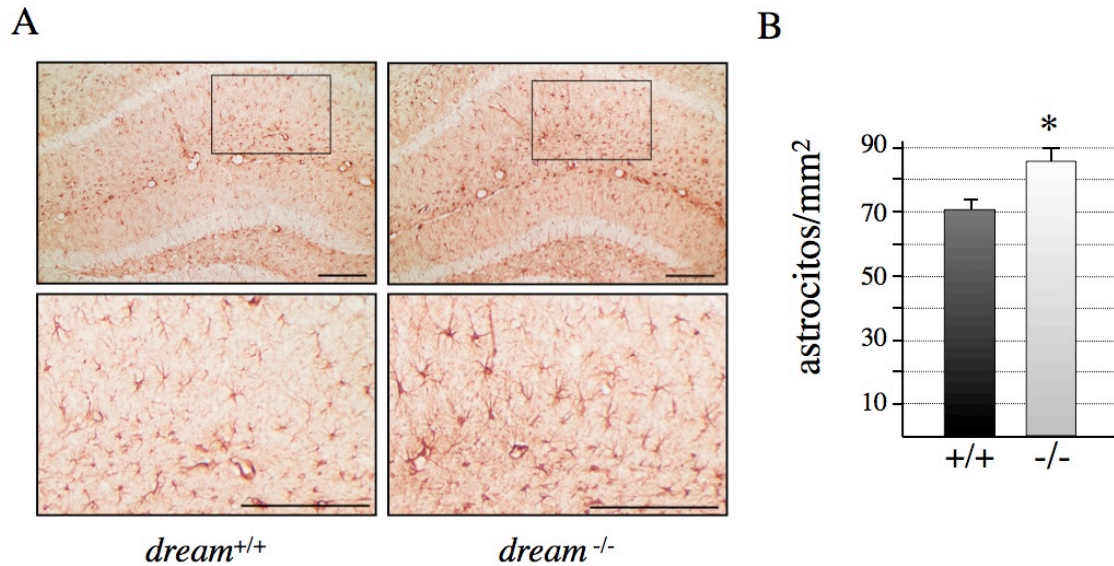


Figura 16. Incremento en el número de astrocitos en el hipocampo de ratones adultos carentes de DREAM. (A) Ejemplos representativos de secciones de hipocampo de ratones deficientes en DREAM (paneles superiores) o silvestres (paneles inferiores), procesadas para la inmunodetección de GFAP y posterior análisis cuantitativo. Los paneles del lateral derecho representan imágenes magnificadas correspondientes a las áreas indicadas por un rectángulo. Escala, 100 μ m. (B) Cuantificación del número de astrocitos, detectados por la expresión de GFAP, encontrados en las secciones similares a las mostradas en el panel A. * $p < 0,05$ (Test de la t de Student).

4.2 Implicación de *Dlx4* en la regulación de la diferenciación neural.

4.2.1. *Dlx4* se expresa en el SNC en desarrollo.

Para determinar la expresión de *Dlx4* en el SNC embrionario utilizamos western immunoblots de extractos tisulares de distintas regiones del SNC de embriones de 17 días de gestación (E17). Para ello utilizamos un antisuero generado en conejo utilizando la proteína de fusión GST-*Dlx4* Δ N, que incluye 64 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de *Dlx4*. El antisuero fue caracterizado utilizando extractos de diferentes líneas celulares, incluyendo las de origen neural RC2.E10 y RH1.C4 (Figura 17).

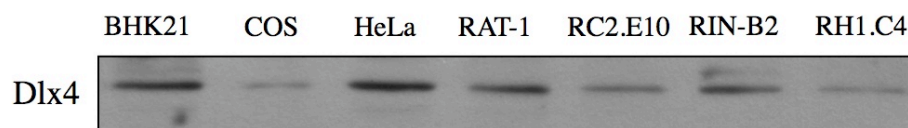


Figura 17. Expresión del factor de transcripción Dlx4 en líneas celulares. Western inmunoblot que demuestra la expresión de Dlx4 en diferentes líneas celulares.

Pudimos observar que la expresión de Dlx4 se encuentra fundamentalmente restringida a la parte anterior del SNC. Concretamente, en el telencéfalo y el diencéfalo detectamos dos pares de bandas inmunoreactivas, el primer par en torno a 30 KDa y el segundo para en torno a los 15 KDa (Figura 18), que podrían corresponder a diferentes isoformas generadas por un procesamiento alternativo del ARNm de Dlx4 (Nakamura et al., 1996). En el mesencéfalo solo detectamos una de las bandas de menor peso molecular, mientras que en el rombencéfalo Dlx4 es indetectable (Figura 18).

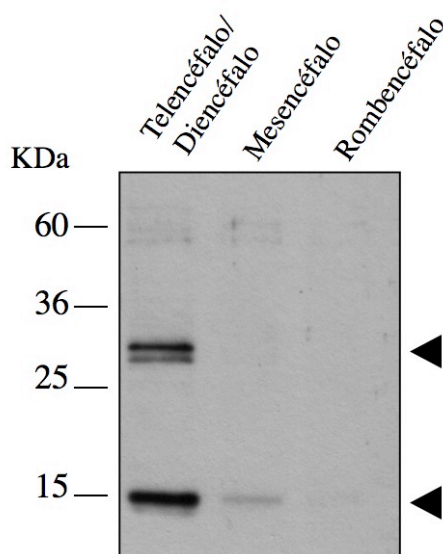


Figura 18. Expresión del factor de transcripción Dlx4 en la región anterior del SNC en desarrollo. Western inmunoblot con anti-Dlx4 de extractos de tejidos celulares del SNC en desarrollo. El esquema superior representa un cerebro embrionario de 17 días de gestación y las líneas de corte delimitan las regiones utilizadas para obtener los extractos en dicho ensayo. El anticuerpo frente a Dlx4 se utilizó a una dilución 1:10000.

4.2.2 Dlx4 es capaz de unirse “*in vitro*” al promotor de GFAP.

Como se ha indicado en la introducción, la expresión de Dlx4 puede inducirse mediante el tratamiento con CNTF en una línea celular de origen neural (véase Figura 3). La actividad de CNTF sobre precursores neuroepiteliales está asociada a la

inducción de la expresión de GFAP y de la diferenciación de astrocitos (Johe et al., 1996; Bonni et al., 1997; Rajan and McKay, 1998; Park et al., 1999; Morrow et al., 2001). Por tanto, decidimos investigar si *Dlx4* se une al promotor del gen *gfap* y regula su expresión. Para ello, estudiar la capacidad de *Dlx4* de unirse a elementos específicos del promotor de *gfap*, y la posible correlación entre la expresión de *Dlx4* y la de *gfap* en cultivos primarios de células precursoras de la corteza cerebral inducidas a diferenciarse en astrocitos.

El promotor del gen de GFAP contiene tres sitios de unión para factores de transcripción de tipo homeodominio que reconocen la secuencia consenso TAAT, y que denominamos GFAP-T1, GFAP-T2 y GFAP-T3 (Figura 19).

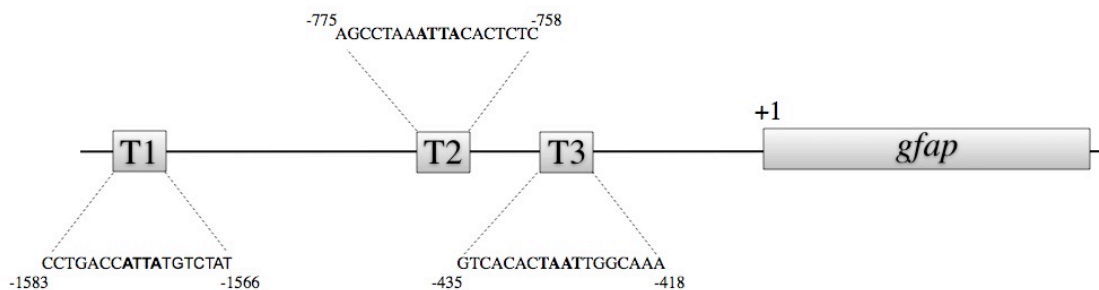


Figura 19. Estructura del promotor de GFAP. Representación gráfica de las regiones reguladoras GFAP-T1, GFAP-T2 y GFAP-T3 de tipo “caja TAAT” existentes en el promotor del gen GFAP, utilizadas para determinar, mediante ensayos de movilidad electroforética, la posible unión de *Dlx4* al promotor de GFAP.

Para investigar si *Dlx4* es capaz de unirse *in vitro* a estos elementos, realizamos ensayos EMSA. La proteína *Dlx4* obtenida a partir de un sistema de reticulocitos de traducción *in vitro* se incubó por separado con tres oligonucleótidos sintéticos que contienen los elementos GFAP-T1, GFAP-T2 y GFAP-T3. Observamos que *Dlx4* es capaz de reconocer a los tres elementos TAAT del promotor de GFAP *in vitro* (Figura 20). Cuando el ensayo de movilidad se realiza en presencia del suero policlonal generado contra *Dlx4*, se observa el retardo aún mayor del complejo específico (super-retardo), que no se produce cuando se utiliza un suero normal de conejo (Figura 21), confirmando la presencia de *Dlx4* en el complejo.

4.2.3 Dlx4 se expresa en cultivos primarios de células precursoras de la corteza cerebral de embriones de 17 días de gestación.

Una vez comprobado que Dlx4 tiene la capacidad de unirse a elementos del promotor de *gfap in vitro*, decidimos utilizar cultivos primarios de células precursoras de la corteza cerebral para investigar si su expresión está relacionada con la diferenciación de astrocitos inducida por CNTF.

Mediante western immunoblots de extractos celulares, comprobamos que Dlx4 se expresa en células precursoras procedentes de la corteza cerebral de embriones de rata de 17 días de gestación (Figura 21A).

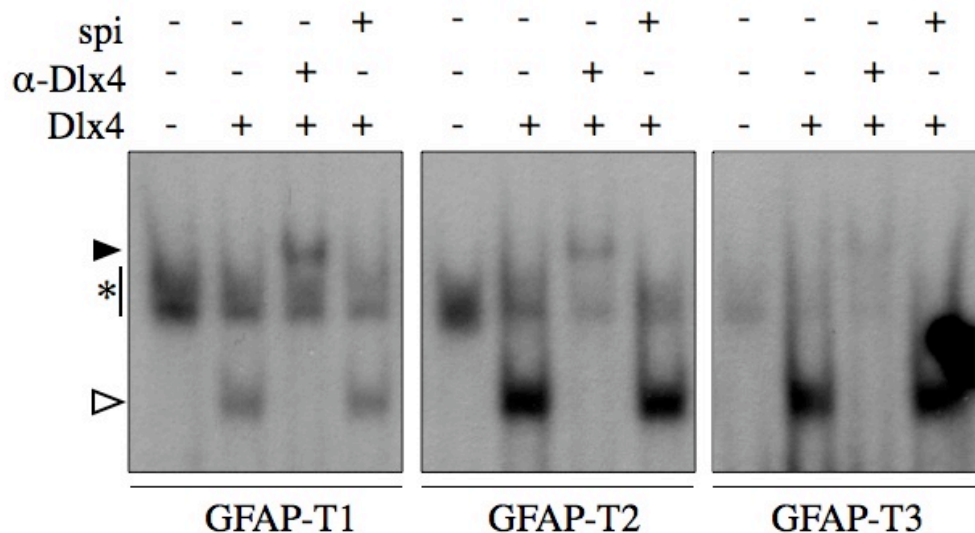


Figura 20. El factor de transcripción Dlx4 es capaz de unirse “*in vitro*” a las tres cajas TAAT del promotor del gen de GFAP. Ensayo de retardo de movilidad la electroforética (EMSA) que muestra la unión de Dlx4, sintetizado *in vitro* en un sistema de extracto de reticulocitos, a los tres elementos TAAT descritos en el promotor de GFAP. Las puntas de flecha blancas indican las bandas correspondientes a Dlx4, las puntas de flechas negras indican un retardo en presencia de un anticuerpo específico anti-Dlx4. El asterisco indica la presencia de bandas inespecíficas. **spi:** suero normal de conejo.

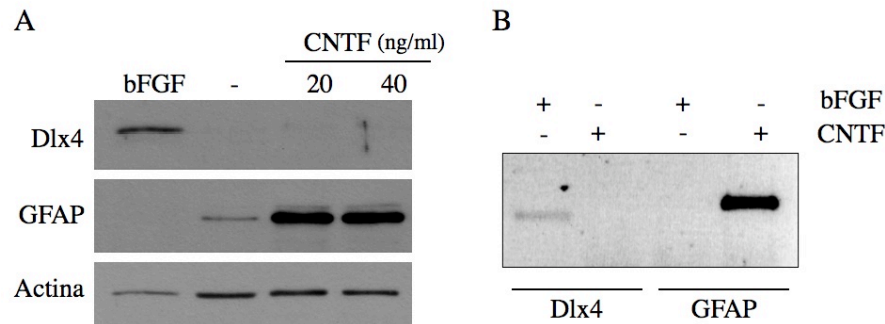


Figura 21. Dlx4 se expresa en precursores corticales de cerebro de ratas de 17 días de gestación y su expresión depende de bFGF. (A) Western blot que muestra la expresión de Dlx4 y GFAP en lisados celulares de cultivos primarios de corteza cerebral de embrión E17 de rata. Como puede observarse, la retirada del bFGF que mantiene a las células indiferenciadas es suficiente para provocar la desaparición de Dlx4. CNTF induce la expresión de GFAP pero no de Dlx4. (B) RT-PCR que muestra los niveles de ARNm de Dlx4 y GFAP a partir del ARN total de cultivos primarios E17 mantenidos en bFGF (20 ng/ml) o CNTF (20 ng/ml).

Los cultivos primarios mantenidos en medio suplementado con bFGF expresan Dlx4 pero no el marcador de astrocitos GFAP. En cambio, cuando se retira el bFGF del medio de cultivo, las células precursoras dejan de expresar Dlx4 y se observa un ligero aumento en la expresión de GFAP consistente con la observación realizada en trabajos anteriores, según la cual, la retirada del bFGF induce la diferenciación espontánea de astrocitos en un 5-10% de las células (McManus et al., 1999; Vallejo and Vallejo, 2002). Del mismo modo, en los cultivos celulares tratados con CNTF se observó un aumento en la expresión de GFAP consistente con la respuesta de inducción de astrocitos, pero no se detecta una estimulación de la expresión de Dlx4 (Figura 21A). Esta reducción en los niveles de expresión de Dlx4 quedó confirmada mediante RT-PCR. Como puede verse en la figura 21B, la retirada de bFGF y el tratamiento de los cultivos primarios con CNTF provoca una disminución en los niveles de ARNm de Dlx4. Por el contrario, los niveles de ARNm de GFAP se encuentran elevados tras el tratamiento con CNTF.

Estos resultados indican que la expresión de Dlx4 es dependiente de bFGF y que el tratamiento con CNTF no induce su expresión, no existiendo correlación entre la expresión de Dlx4 y GFAP.

4.2.4 La sobre expresión de Dlx4 en cultivos primarios tratados con CNTF no altera la activación del promotor de GFAP.

Habida cuenta de que la inducción de la expresión de GFAP por CNTF va precedida de la inhibición de la expresión de Dlx4, nos planteamos la posibilidad de que este factor de transcripción pudiese actuar como represor del gen de GFAP.

Con el fin de dilucidar si Dlx4 inhibe indirectamente el promotor de GFAP, se llevaron a cabo transfecciones transitorias en cultivos primarios de células de la corteza cerebral embrionaria de rata de 17 días de gestación. Para ello se cotransfectaron el plásmido testigo GFAP-A7Luc que porta el promotor de GFAP y el plásmido de expresión pcDNA3-Dlx4, tras lo cual las células se incubaron en presencia o ausencia de CNTF. Como puede observarse en la figura 22, la sobre-expresión de Dlx4 en células tratadas con CNTF no altera la actividad luciferasa promovida por el promotor de GFAP.

Todos estos resultados indican que no es probable que la homeoproteína Dlx4 intervenga en la regulación de la expresión del gen GFAP durante la generación de astrocitos, por lo que decidimos centrar nuestra atención sobre otros procesos neurogénicos.

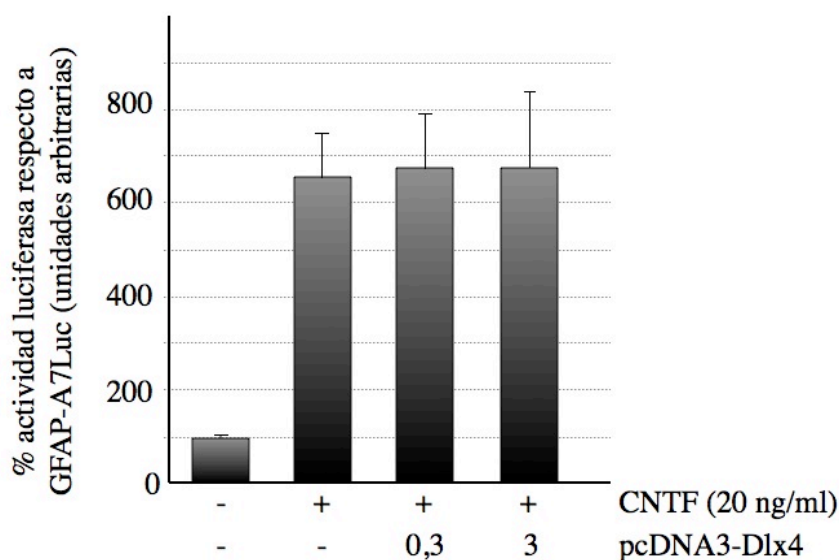


Figura 22. La sobre-expresión de Dlx4 en cultivos primarios tratados con CNTF no reprime la activación del promotor de GFAP. Noveles de actividad luciferasa observada en cultivos primarios de células precursoras de la corteza cerebral de rata cotransfectadas con el plásmido testigo GFAP-A7Luc y un vector de expresión que codifica Dlx4. Las células se trataron con CNTF (20 ng/ml) para estimular la actividad de GFAP-A7Luc. Los valores actividad luciferasa se encuentran normalizados frente a la expresión de renilla y posteriormente referidos a la expresión de un plásmido control RSV-Luc.

4.2.5 Patrón de expresión de *Dlx4* durante el desarrollo del telencéfalo.

Habiendo descartado un posible papel de *Dlx4* en la regulación de la diferenciación de astrocitos, decidimos investigar si su expresión durante el desarrollo embrionario está relacionada con el proceso de neurogénesis.

Con el fin de comprobar la expresión de *Dlx4* durante la neurogénesis en el telencéfalo realizamos ensayos de inmunofluorescencia en secciones sagitales de embriones de rata de 14 días de gestación.

Como se observa en la figura 23, la expresión de *Dlx4* se restringe fundamentalmente a la zona ventricular de la corteza cerebral, mientras que la expresión del marcador Tuj-1, que reconoce la isoforma III de la β -tubulina específica de neuronas, se localiza exclusivamente en la placa cortical de la corteza cerebral embrionaria (Figura 23). En la zona subventricular, la expresión de *Dlx4* se adapta a formas radiales coherentes con la morfología de las células de la glía radial existentes en esa zona. *Dlx4* también se expresa en grupos celulares discretos de la placa cortical que expresan Tuj-1.

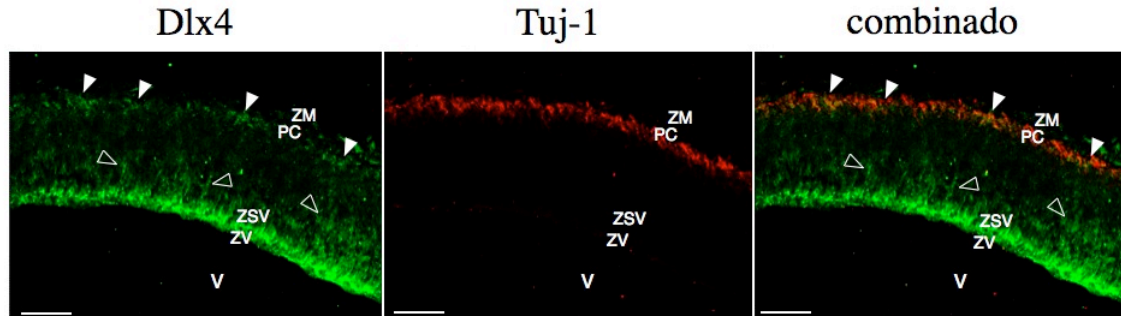


Figura 23. Expresión de *Dlx4* en el telencéfalo de embriones de rata de 14 días de gestación. Detección inmunohistológica por fluorescencia confocal que refleja la expresión de *Dlx4* (verde) y del marcador neuronal Tuj-1 (rojo) en secciones sagitales de la corteza cerebral de embriones de 14 días de gestación. *Dlx4* se expresa en la zona ventricular, en la zona subventricular (puntas de flecha vacías) y en grupos celulares discretos de la placa cortical (puntas de flechas blancas) de la corteza cerebral en desarrollo. Por su parte, Tuj-1 únicamente se expresa en la placa cortical. **V:** ventrículo; **ZV:** zona ventricular; **ZSV:** zona subventricular; **PC:** placa cortical; **ZM:** zona marginal. Escala, 100 μ m.

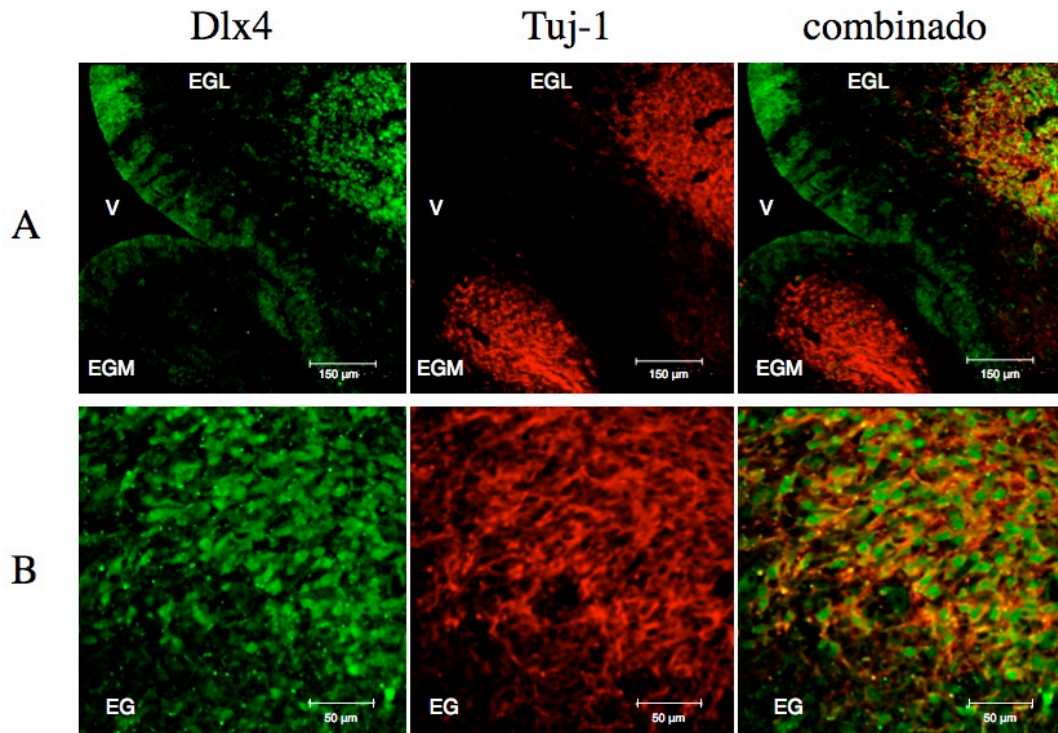


Figura 24. Expresión de Dlx4 en las eminencias gangliónicas de embriones de rata de 14 días de gestación. (A) Eminencia gangliónica lateral (EGL) y medial (EGM) de un corte coronal del telencéfalo mostrando la expresión de Dlx4 tanto en la zona ventricular como en el interior. Nótese que Dlx4 se localiza en el citoplasma de las células ventriculares, mientras que adquiere una distribución nuclear tras la diferenciación neuronal evidenciada mediante la coexpresión de Tuj-1. (B) Detalle de la eminencia gangliónica (EG) mostrando la colocalización celular del marcador neuronal Tuj-1 junto la expresión citoplasmática y nuclear de Dlx4. Escala, 50 µm. Escala, 150 µm.

Cuando analizamos secciones coronales de telencéfalo observamos que, al igual que en la corteza cerebral, en la región ventricular de las eminencias gangliónicas lateral y medial se observa la expresión citoplasmática de Dlx4. En cambio, en el interior de las eminencias gangliónicas, donde se genera un gran número de interneuronas, se observan neuronas diferenciadas como evidencia la coexpresión de Tuj-1 y Dlx4, que se distribuye nuclearmente (Figura 24).

En el análisis la expresión de Dlx4 en el telencéfalo de embriones de 15 días de gestación observamos que el patrón de expresión Dlx4 en la corteza cerebral ha cambiando respecto a embriones E14. A los 15 días de gestación, Dlx4 se expresa en neuronas de la placa cortical de la corteza cerebral dorsal y lateral (Figura 25B-1 y 25B-4). Además, en la región ventral del telencéfalo, Dlx4 se expresa en las neuronas que se generan en septum (Figura 25B-2) y en las neuronas de la eminencia gangliónica lateral. (Figura 25B-3).

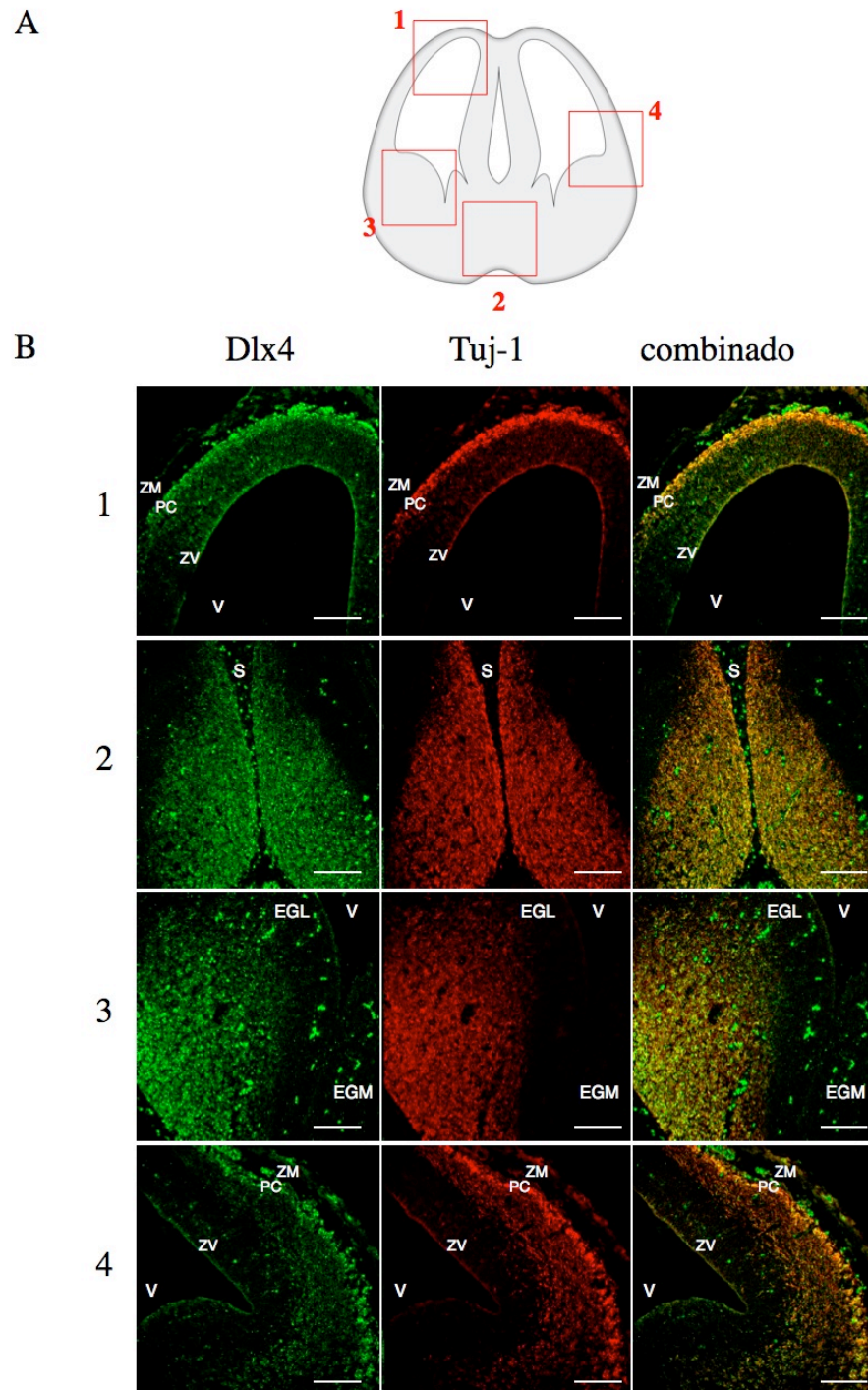


Figura 25. Expresión de Dlx4 en el telencéfalo de embriones de rata de 15 días de gestación. (A) Dibujo esquemático de una sección coronal de la región craneal de un embrión de 15 días de gestación teñido con violeta de cresilo donde se representan con rectángulos la regiones que se muestran en el panel C. (B) Secciones coronales de embriones de 15 días de gestación que muestran distintas regiones del telencéfalo (1-4), representadas en A, donde se muestra la expresión de Dlx4 y Tuj-1 mediante inmunohistoquímica por fluorescencia confocal. Dlx4 y Tuj-1 se coexpresan en neuronas de la placa cortical de la corteza cerebral y *subpallium* (1 y 4, respectivamente) y en neuronas del septum y de la eminencia gangliónica lateral (2 y 3 respectivamente), pero Dlx4 no se expresa en neuronas que migran tangencialmente desde la eminencia a la corteza cerebral (4). V: ventrículo; ZV: zona ventricular; ZI: zona intermedia; PC: placa cortical; ZM: zona marginal; EGM: eminencia gangliónica medial, EGL: eminencia gangliónica lateral; S: septum Escala 150 μ m.

En secciones sagitales del telencéfalo dorsal de embriones de 17 días de gestación se observa un patrón de expresión de *Dlx4* similar. Nuevamente, comprobamos la expresión citoplasmática de *Dlx4* en las regiones ventricular y subventricular, su ausencia en la zona intermedia por donde discurren hacia la corteza cerebral numerosas interneuronas, y su expresión, tanto citoplasmática como nuclear en la placa cortical de la corteza cerebral (Figura 26). Además, la inmunodetección conjunta de *Dlx4* junto al marcador neuronal Tuj-1 muestra la existencia de dos tipos de neuronas, aquellas que no expresan *Dlx4* y se encuentran en la zona intermedia y aquellas que coexpresan *Dlx4* y Tuj-1 en la placa cortical.

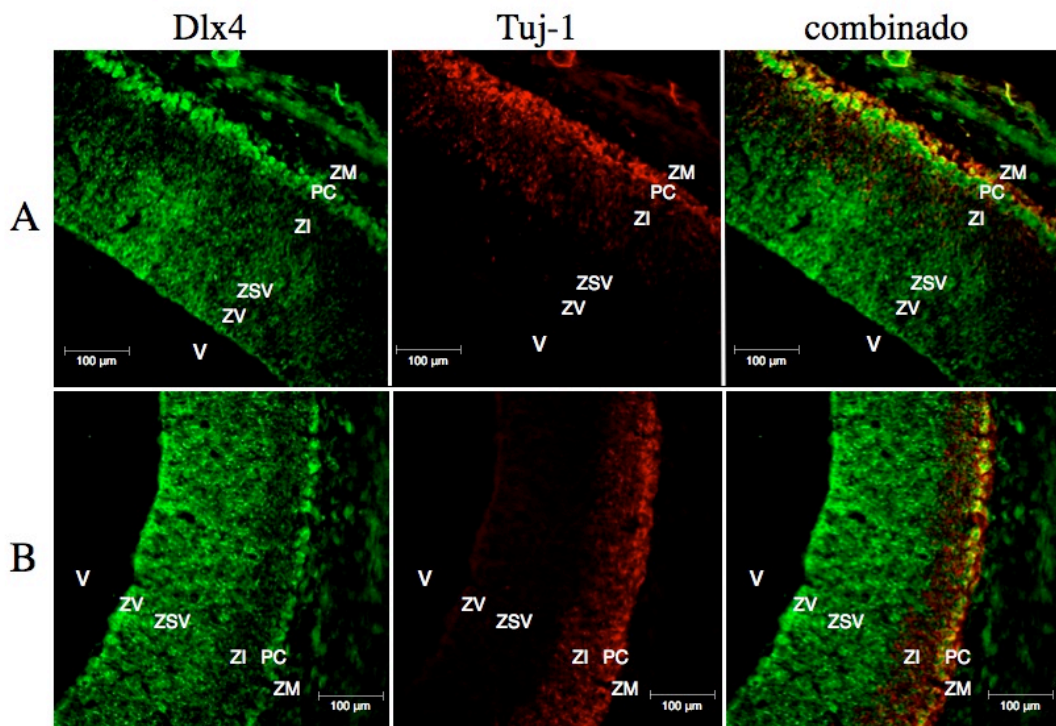


Figura 26. Expresión de *Dlx4* en el corteza cerebral de embriones de rata de 17 días de gestación. Expresión de Tuj-1 y *Dlx4* en el telencéfalo de embriones de rata de 17 días de gestación (E17) evidenciada mediante inmunofluorescencia detectada por microscopía confocal. Los paneles A) y B) muestran la expresión de *Dlx4* en la región dorsal y frontal (anterior a la derecha), respectivamente, de secciones sagitales de corteza cerebral. Obsérvese la expresión citoplasmática de *Dlx4* en la zona ventricular (ZV) y subventricular (ZSV), su ausencia en la zona intermedia (ZI) y su expresión citoplasmática y también nuclear en la placa cortical (PC) en neuronas Tuj-1 positivas de la corteza cerebral. V: ventrículo; ZM: zona marginal. Escala, 100 µm.

En ensayos inmunohistoquímicos sobre la región del *subpallium* de secciones coronales de embriones E17 se confirma la expresión de *Dlx4* en el neuroepitelio ventricular y en las neuronas de las regiones más distales respecto al ventrículo,

mientras que en la región intermedia, por donde discurren las neuronas que migran tangencialmente a la corteza cerebral, no se detecta la expresión de *Dlx4* (Figura 27).

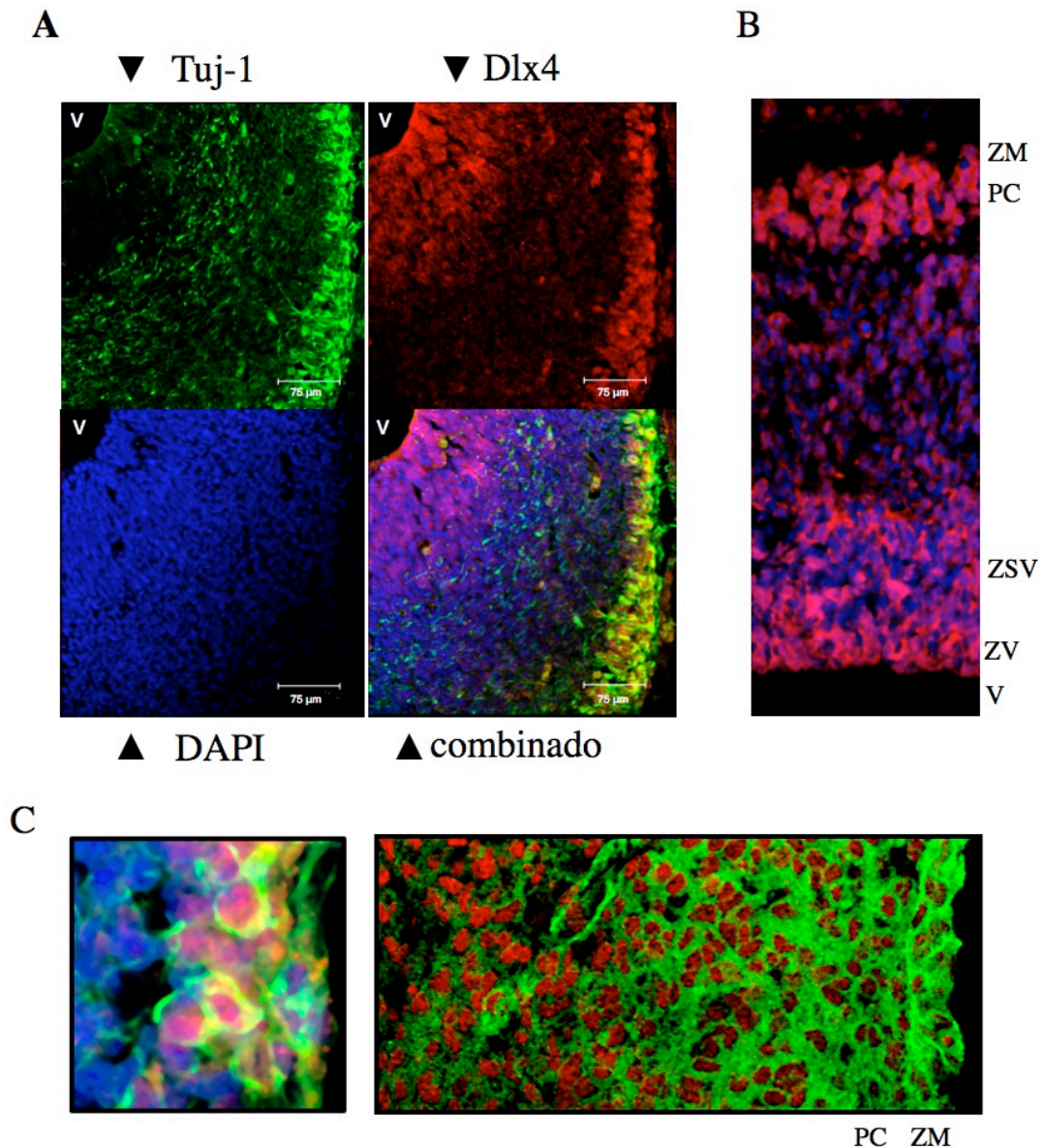


Figura 27. *Dlx4* se expresa en neuronas de proyección de las zona marginales pero no en las neuronas que migran tangencialmente al neocorteza cerebral. (A) Distribución de la expresión de *Dlx4* (rojo) y Tuj-1 (verde) evidenciada en un corte coronal del telencéfalo de embrión de rata E17 mediante microscopía confocal. *Dlx4* se expresa principalmente en el citoplasma de células ventriculares (V) y en las neuronas de la región marginal, donde *Dlx4* también se expresa en el núcleo. En cambio, las neuronas que migran tangencialmente hacia el corteza cerebral, a través de la zona intermedia, no expresan *Dlx4*. (B) Sección sagital de una corteza cerebral de embrión de 17 días de gestación que muestra en detalle la variación en la expresión intracelular de *Dlx4* (rojo). En las células precursoras de las zonas ventricular y subventricular (ZV y ZSV) *Dlx4* se expresa preferentemente en el citoplasma, mientras que en la placa cortical, su expresión también es nuclear. (C) Fotomicrografías a mayor aumento que muestra la expresión nuclear de *Dlx4* (rojo) en neuronas que expresan el marcador neuronal Tuj-1 (verde). El color azul indica núcleos celulares teñidos con DAPI. Escala, 75 μ m.

4.2.6 La diferenciación neuronal inducida por BDNF conlleva un aumento en la expresión de *Dlx4*.

La presencia de *Dlx4* en neuronas de la placa cortical, pero no en las neuronas que migran tangencial o radialmente en la zona intermedia (ZI), sugiere que la inducción de su expresión está asociada a la diferenciación terminal de ciertas poblaciones de neuronas. Para investigar si la expresión de *Dlx4* se induce por señales neurogénicas utilizamos cultivos primarios de células precursoras de corteza cerebral de embriones de 14 días de gestación. Observamos expresión moderada de *Dlx4* en células precursoras mantenidas en presencia de bFGF para su expansión e indiferenciación (Figura 28). Además, la ausencia, prácticamente total, de expresión del marcador Tuj-1 demuestra la ausencia de neuronas. Cuando las células se trataron con BDNF durante 10 días para inducir la diferenciación de neuronas, pudimos comprobar que ésta se acompaña de un marcado aumento de la expresión de *Dlx4* en el citoplasma y núcleo, y que las células que no habían diferenciado en neuronas mantenían los niveles de expresión basales detectados para *Dlx4* en condiciones de proliferación (Figura 28, BDNF).

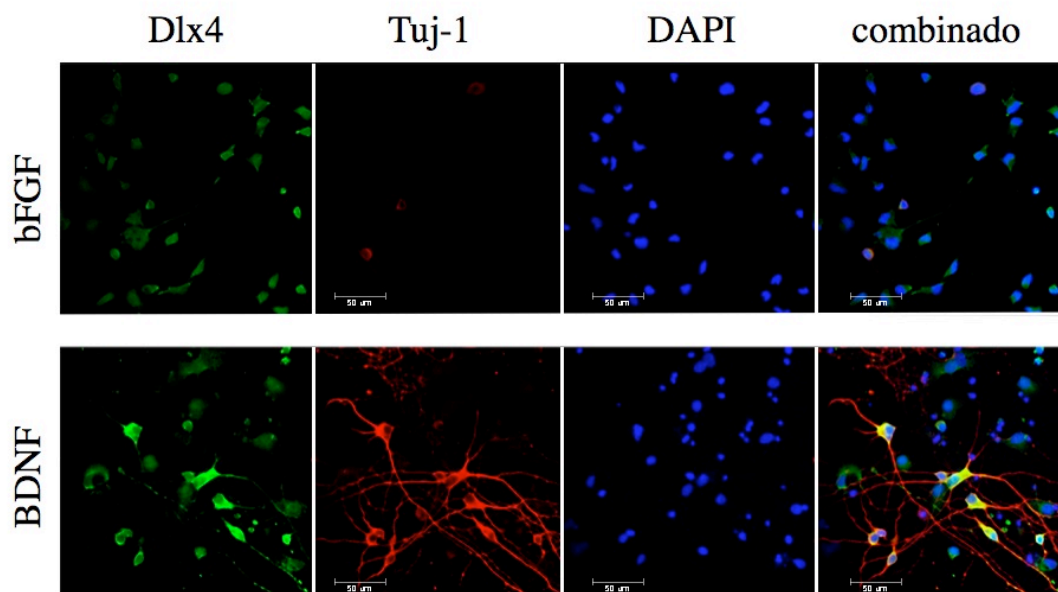


Figura 28. La diferenciación neuronal de precursores corticales se acompaña de un aumento de la expresión de *Dlx4*. Localización inmunohistoquímica de *Dlx4* y Tuj-1 detectada por microscopía confocal en cultivos primarios de células de la corteza cerebral de embrión de rata de 14 días de gestación. Las células se mantuvieron en bFGF (20 ng/ml) o en BDNF (50 ng/ml) durante 10 días. El tratamiento con BDNF induce un aumento en la expresión de *Dlx4* en células que coexpresan el marcador neuronal Tuj-1.

La inducción de *Dlx4* por BDNF fue confirmada en ensayos de western immunoblot con cultivos primarios corticales similares. Pudimos observar cómo la inducción de *Dlx4* por BDNF tiene lugar entre el séptimo y el décimo día de diferenciación (Figura 29). Al igual que lo observado en la inmunocitoquímica, en estado proliferativo, las células se encuentran expresando niveles basales de *Dlx4*. Estos niveles basales desaparecen completamente cuando retiramos el mitógeno del medio, al igual que sucediera con los cultivos primarios corticales de 17 días de gestación (véase Figura 21).

Por lo tanto estos experimentos muestran la existencia de una correlación entre la expresión de *Dlx4* y la diferenciación neuronal mediada por BDNF.

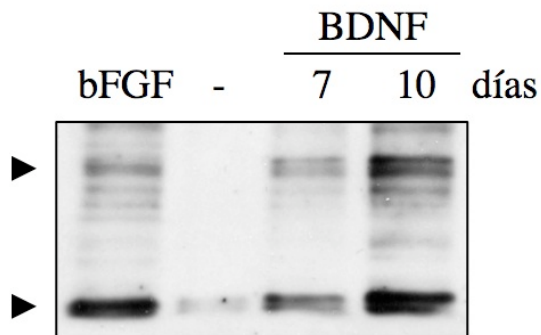


Figura 29. *Dlx4* aumenta su expresión en la fase terminal de la diferenciación neuronal por BDNF. Western immunoblot en el que se muestra la inducción de *Dlx4* tras el tratamiento con BDNF. El ensayo se realizó a partir de lisados celulares de cultivos primarios de corteza cerebral de embriones de rata de 14 días de gestación mantenidos en presencia de bFGF (20 ng/ml), en ausencia de tratamiento o tras el tratamiento con BDNF (50 ng/ml) durante 7 o 10 días.

Discusión

DISCUSIÓN

5.1 Papel de DREAM en la diferenciación de astrocitos.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que PACAP es capaz de inducir la diferenciación de astrocitos a partir de células progenitoras de la corteza cerebral fetal mediante la estimulación de la síntesis de AMPc tras su unión específica a receptores de tipo PAC1 (Vallejo and Vallejo, 2002). La expresión de PACAP y de sus receptores durante el desarrollo de la corteza cerebral está bien documentada (Skoglosa et al., 1999; Jaworski and Proctor, 2000; Suh et al., 2001), lo cual proporciona apoyo a la idea según la cual PACAP puede tener un papel fisiológico sobre la generación de astrocitos a través de la producción de AMPc en células progenitoras corticales.

Se conoce que el AMPc puede activar tres vías de señalización distintas. Una dependiente de la activación de la proteína quinasa A (PKA) y la consecuente fosforilación de CREB; otra dependiente de la activación de Epac, lo que produce la estimulación de la GTPasa Rap1 (Bos, 2003); y por último, otra dependiente de la estimulación de Ras a través de la activación de CNRasGEF (Pham et al., 2000). Hemos comprobado que la estimulación de la transcripción del gen *gfap* y la diferenciación de astrocitos por PACAP es independiente de la activación PKA, pero requiere la activación conjunta de las GTPasas Ras y Rap1 (Lastres-Becker et al., 2008). Aún no se conocen los mecanismos moleculares por los que Ras y Rap1 estimulan la activación transcripcional del promotor de *gfap* aunque se ha descrito que la activación de Ras o Epac puede provocar cambios en la concentración intracelular de calcio (Fitzgerald, 2000; Ster et al., 2007). En consonancia con ello, la estimulación de la diferenciación en astrocitos de las células precursoras corticales por PACAP provoca un incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} que promueve la activación transcripcional del gen de *gfap* (Cebolla et al., 2008). En este proceso, los trabajos previos del laboratorio demostraron que DREAM se une físicamente a dos regiones específicas del promotor de *gfap* y que su actividad como transactivador transcripcional depende del incremento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} inducidos por la señal PACAP-AMPc.

En esta tesis se muestran resultados experimentales que demuestran que el factor de transcripción DREAM es esencial para la correcta regulación del proceso de

diferenciación de astrocitos *in vivo*. Por todo ello, proponemos que la cascada de señalización PACAP-AMPC- Ca^{2+} -DREAM constituye una nueva vía de señalización para la generación de astrocitos durante el desarrollo cerebral.

Los ensayos *in vitro* que hemos llevado a cabo han puesto de manifiesto que DREAM es esencial para la expresión de GFAP durante la diferenciación de astrocitos. Los precursores corticales de ratones deficientes en DREAM no responden a la estimulación con PACAP, aunque mantienen su capacidad de diferenciarse en astrocitos cuando se estimulan con CNTF. Al igual que otras citoquinas neurotróficas, CNTF induce la diferenciación de astrocitos mediante la activación de la vía de señalización gp130-JAK-STAT (Bonni et al., 1997; Rajan and McKay, 1998; Nakashima et al., 1999c). Estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que las vías de señalización inducidas por PACAP y CNTF en precursores corticales pueden actuar sinérgicamente durante la astrocitogénesis (Cebolla and Vallejo, 2006), del mismo modo que lo hacen otros factores astrogénicos como el CNTF y los BMPs (Nakashima et al., 1999b; Rajan et al., 2003). Así, la estimulación conjunta con PACAP y CNTF provoca la diferenciación de astrocitos con una morfología más elaborada y prolongaciones de mayor longitud (Cebolla and Vallejo, 2006). A pesar de la existencia de estas interacciones, nuestros resultados indican que la vía de señalización CNTF-gp130-JAK-STAT funciona de forma independiente de la vía de señalización PACAP-AMPC- Ca^{2+} -DREAM.

El posible papel fisiológico de PACAP sobre la diferenciación astrogial también se refleja en estudios en los que se observó que el tratamiento de ratas preñadas durante el periodo final de la gestación con un antagonista de los receptores de PACAP produce en las crías una reducción en el número de astrocitos corticales dependiente de la dosis administrada y evidente durante el periodo postnatal (Zupan et al., 1998). Estas observaciones son consistentes con nuestros resultados, que muestran que los ratones deficientes en DREAM presentan una disminución en los niveles de GFAP y en el número de astrocitos cerebrales después del nacimiento. En las investigaciones con el antagonista de PACAP realizada por Zupan y cols. (1998) quedó demostrado que, en ratones de 5 días de edad, existían regiones del cerebro que no mostraban variaciones en el número de astrocitos. Sin embargo, en nuestro estudio, la vía de señalización PACAP-AMPC- Ca^{2+} -DREAM parece ser un mecanismo general de inducción de la diferenciación de astrocitos ya que el descenso en el número de astrocitos se observa en todas las regiones del cerebro examinadas en los ratones carentes de DREAM.

Nuestros resultados muestran que la carencia de DREAM no previene, sino retrasa, la expresión de GFAP y la formación de astrocitos *in vivo*, a pesar de que las células carentes de DREAM no respondan a PACAP *in vitro*. Sorprendentemente, los ratones deficientes en DREAM, además de mostrar un descenso en el número de astrocitos, también muestran un incremento en el número de neuronas. Esta observación es consistente con la posibilidad de que la neurogénesis en ratones *dream*^{-/-} no haya sido inhibida a tiempo y las células progenitoras continúen produciendo neuronas en lugar de astrocitos.

La idea de un posible papel inhibitorio de DREAM sobre el proceso de neurogénesis se apoya en la observación según la cual las neuroesferas preparadas a partir de células progenitoras de la corteza cerebral de ratones carentes de DREAM son capaces de generar más neuronas ante una señal neurogénica como BDNF. Esta actividad inhibitoria de DREAM podría formar parte de los mecanismos transcripcionales que regulan la transición de la neurogénesis a la gliogénesis. Se sabe que la acción inhibitoria de algunos factores de transcripción durante la neurogénesis es fundamental para determinar la finalización de ésta y el comienzo de la astrogénesis. Así, por ejemplo, se ha demostrado que la expresión ectópica de los factores de transcripción de tipo bHLH Id1 e Id2, inhibidores endógenos de la expresión de los genes proneurales de tipo bHLH, provoca la inhibición de la neurogénesis (Cai et al., 2000; Toma et al., 2000) al tiempo que promueve la gliogénesis (Cai et al., 2000).

Por tanto, una posible interpretación de nuestros resultados es que, en los precursores corticales, DREAM puede formar parte de un mecanismo de señalización involucrado en la inhibición coordinada de la neurogénesis al mismo tiempo que estimula la astrogénesis. Este posible papel inhibitorio de DREAM podría ejercerse directamente sobre mecanismos que controlan la expresión génica, ya que se ha demostrado que DREAM regula la expresión de diferentes genes neuronales al actuar como represor transcripcional (Carrión et al., 1999; Link et al., 2004; Gómez-Villafuertes et al., 2005).

Como hemos mencionado anteriormente, las señales que actúan sobre los precursores corticales estimulando la astrogliogénesis al mismo tiempo que inhiben la neurogénesis son importantes para regular la sincronización de la transición entre neurogénesis y gliogénesis (Miller and Gauthier, 2007). Por tanto, si estas señales fallan, cabría esperar una excesiva producción de neuronas a expensas de la producción de astrocitos, los cuales estarían presentes en menor número al inicio del periodo

astrogliogénico. Nuestras observaciones se ajustan a este modelo, y de este modo, apoyan la idea según la cual DREAM puede formar parte del complejo mecanismo que opera durante la transición entre neurogénesis y astrogliogénesis.

El número relativamente elevado de astrocitos generados en ratones deficientes en DREAM a partir de los 7 días de edad postnatal indica que han sido activados mecanismos que compensan la carencia inicial de astrocitos produciéndose un ajuste entre el número de células gliales y el número de neuronas. La existencia de estos mecanismos compensatorios ha sido propuesta con anterioridad (Koblar et al., 1998; Barnabe-Heider et al., 2005; Miller and Gauthier, 2007), y podrían involucrar, al menos en parte, la actividad de citoquinas neurotróficas, como la cardiotropina-1, derivadas de las neuronas (Barnabe-Heider et al., 2005). En el caso de los ratones deficientes en DREAM, la observada sobreproducción inicial de neuronas corticales como consecuencia de un defecto en la acción inhibitoria de DREAM tendría como consecuencia un entorno extracelular enriquecido en citoquinas neurotróficas producidas por las neuronas, lo que se traduciría en un relativo aumento en el número de astrocitos en periodos posteriores.

Se ha descrito que la cardiotropina-1, una citoquina neurotrófica que actúa a través del mismo mecanismo que lo hace CNTF, esto es, a través de la vía de señalización gp130-JAK-STAT (Bonni et al., 1997; Koblar et al., 1998; Rajan and McKay, 1998; Nakashima et al., 1999c; Barnabe-Heider et al., 2005), es expresada y liberada por las neuronas recién diferenciadas de la corteza cerebral y proporciona la principal señal promotora de la diferenciación de astrocitos (Barnabe-Heider et al., 2005). Nuestros experimentos con CNTF en precursores corticales muestran que esta vía de señalización no se encuentra afectada por la ausencia de DREAM. Por tanto, es muy posible que el aumento tardío del número de astrocitos en los ratones deficientes en DREAM pueda ser debido al excesivo aumento de los niveles de cardiotropina-1 generados como consecuencia de la existencia de un mayor número de neuronas.

En resumen, en esta tesis doctoral presentamos evidencias a favor de un papel de DREAM en los mecanismos de diferenciación de astrocitos en el cerebro de ratón *in vivo* y en la sincronización de los procesos de neurogénesis y astrogénesis. Por tanto, estos resultados proporcionan nuevas perspectivas sobre los mecanismos que regulan la astrocitogénesis durante el desarrollo del corteza cerebral.

5.2 Dlx4 no participa en la regulación del gen *gfap*.

Hasta la fecha no se ha publicado estudios que documenten la expresión de Dlx4 en el SNC, donde otras proteínas de esta familia tienen importantes funciones. Los datos referentes a la expresión de Dlx4 mostrados en esta tesis doctoral constituyen la primera evidencia de su expresión neural durante el desarrollo embrionario.

Los datos experimentales previos obtenidos por RT-PCR indican que Dlx4 se expresa en el SNC de rata durante el desarrollo embrionario y fetal, mostrando un pico de expresión entre los 15 y 16 días de gestación. Además, los patrones de expresión temporal y espacial de Dlx4 son diferentes a los que muestran Dlx2 y Dlx5, otros miembros de la familia Dlx importantes durante los procesos de diferenciación neuronal y pertenecientes a cada una de las otras dos asociaciones bigénicas de la familia Dlx. La expresión neural de Dlx4 ha quedado confirmada mediante western immunoblots y la detección inmunohistoquímica de extractos y secciones de tejido cerebral de distintas edades embrionarias.

La exposición de células de la línea de origen neural RC2.E10 a distintos factores neurotróficos mostró que la expresión de Dlx4 se estimula significativamente con CNTF. Las células RC2.E10 retienen características fenotípicas propias de precursores neurales como son la expresión de nestina, la dependencia de bFGF para su proliferación y la estimulación de la diferenciación por factores externos (McManus et al., 1999). Estas células constituyen una línea monoclonal establecida mediante la expresión de un oncogen a partir de cultivos primarios de precursores corticales y ha sido utilizada como modelo para la diferenciación cortical de astrocitos (McManus et al., 1999).

Estos datos, junto a la observada capacidad que muestra Dlx4 para unirse a la tres cajas TAAT presentes en el promotor de GFAP, sugirieron que Dlx4 podría participar en procesos de diferenciación de astrocitos al regular la expresión del gen de *gfap* en respuesta a citoquinas. Sin embargo, hemos demostrado que, en cultivos primarios de precursores corticales de embriones de rata de 17 días de gestación, la expresión de Dlx4 es dependiente de la presencia de bFGF y no guarda relación aparente con la diferenciación astrogliar inducida por CNTF. La simple retirada del mitógeno bFGF, que mantiene las células progenitoras en fase proliferativa, y por consiguiente,

indiferenciadas, ya supone una inhibición de la expresión de Dlx4. Además, la adición de CNTF no incrementa sus niveles de expresión.

En cualquier caso, la expresión de Dlx4 dependiente de bFGF en células progenitoras corticales podría ser compatible con una actividad represora de Dlx4 sobre el gen *gfap*. Esta hipótesis estaría en consonancia con la observada actividad represora mostrada por la isoforma mayor de Dlx4, denominada BP-1, sobre el gen de la β -globina humana al unirse a dos secuencias silenciadoras de su promotor (Fu et al., 2001). De este modo, Dlx4 podría actuar mediante un mecanismo similar al utilizado por el factor de transcripción ATF5, que es capaz de prevenir la diferenciación de los progenitores neurales de la zona ventricular y subventricular en astrocitos (Angelastro et al., 2005). Para que esta pueda llevarse a cabo, es necesaria la inhibición de la expresión de ATF5. En contraposición a esto, la sobreexpresión de Dlx4, en transfecciones transitorias realizadas en cultivos celulares de precursores corticales tratados con CNTF, no provoca la represión de la activación del promotor de *gfap*. Por tanto, podemos concluir que Dlx4 no actúa como represor de la actividad transcripcional del promotor de *gfap*.

La diferencia en el patrón de la expresión de Dlx4 tras el tratamiento con CNTF observada entre las células RC2.E10 y los cultivos primarios de precursores corticales puede deberse a la existencia de diferencias fenotípicas propias de cada sistema celular. En este sentido, es importante interpretar los datos obtenidos a partir de líneas celulares con cautela, ya que el proceso de immortalización y/o la selección clonal puede generar fenotipos que no son representativos de la población celular de la que parten.

En conclusión, Dlx4 no participa en los mecanismos que estimulan la expresión de GFAP durante la diferenciación de astrocitos.

5.3 Implicación de Dlx4 en la regulación de la diferenciación y regionalización neuronal.

Los estudios inmunohistoquímicos llevados a cabo durante el periodo neurogénico que comprende, al menos, desde el día E14 al día E17 del desarrollo embrionario de la rata, ponen de manifiesto que Dlx4 se expresa tanto en el telencéfalo ventral como el telencéfalo dorsal. Su expresión, por tanto, coincide temporalmente con la expresión de los miembros de la familia Dlx durante el desarrollo del SNC (Anderson

et al., 1997a; Liu et al., 1997; Eisenstat et al., 1999). Estos datos reflejan la relevancia que tienen los factores de transcripción de la familia *Dlx* durante el proceso de desarrollo del SNC .

A lo largo de esta investigación, hemos comprobado que *Dlx4* se expresa en las células progenitoras de la zona ventricular que conforman el neuroepitelio, en las neuronas del interior de la eminencias gangliónicas y en las neuronas diferenciadas que constituyen la placa cortical embrionaria, si bien, en embriones de 14 días de gestación, *Dlx4* solo se expresa en grupos discretos de neuronas de dicha placa. También hemos puesto de manifiesto que la expresión de *Dlx4* permite distinguir entre dos poblaciones neuronales. Por un lado, aquellas neuronas que coexpresan *Dlx4* y *Tuj-1* y que se localizan en la placa cortical y en las zonas más profundas y alejadas del ventrículo, en las eminencias gangliónicas. Y por otro lado, aquellas neuronas que no expresan *Dlx4*, que corresponden a neuronas que se encuentran migrando radialmente a través de la zona intermedia o que surgen de las eminencias gangliónicas y migran tangencialmente hacia el telencéfalo dorsal. Esta última población de neuronas puede que se trate de interneuronas que expresan *Dlx1* y *Dlx2* (Marín et al., 2000; Pleasure et al., 2000; Anderson et al., 2001). Esto podría suponer la existencia de diferentes patrones de expresión entre los distintos genes *Dlx* y, por lo tanto, funciones específicas para cada uno de ellos durante los procesos de diferenciación de distintos subtipos neuronales o la adopción de distintos patrones migratorios. Así, las interneuronas que surgen de la eminencia gangliónica lateral y migran tangencialmente hacia la corteza expresarían *Dlx1* y *Dlx2*, pero no *Dlx4*.

Estas observaciones sugieren la existencia de dos funciones de *Dlx4* durante el desarrollo del telencéfalo. Por un lado, una función asociada a su posible implicación en el mantenimiento del fenotipo de las células precursoras de la zona ventricular, y por otro lado, una función asociada a la diferenciación terminal de las neuronas una vez que han ocupado su lugar en la placa cortical o en la eminencia gangliónica.

El posible papel de *Dlx4* en el mantenimiento del fenotipo de las células precursoras ventriculares se apoya en nuestras observaciones según las cuales, la expresión de *Dlx4* en cultivos de precursores corticales es dependiente de la presencia de bFGF que mantiene las células en estado proliferativo y es esencial para su supervivencia. En este sentido se ha descrito que la inhibición de *Dlx4* promueve la apoptosis en células de coriocarcinoma de la placenta humana y en células tumorales K562 de leucemia mieloide (Shimamoto et al., 1999; Sun et al., 2006). Por lo tanto, es

posible que pueda ejercer funciones asociadas al mantenimiento de la proliferación y supervivencia de los precursores neurales del SNC.

Si nos centramos en la posible función de Dlx4 en el proceso de diferenciación neuronal, nuestros resultados indican que la expresión de Dlx4 puede estar relacionada con los procesos de diferenciación terminal de las neuronas y la adquisición de un fenotipo neuronal determinado. En relación con esto, los ensayos inmunohistoquímicos muestran de forma clara que Dlx4 no se expresa en neuronas inmaduras que están en proceso migratorio. Así, hemos observado que las neuronas que se encuentran migrando en la zona intermedia de la corteza cerebral y en la región de transición entre el telencéfalo ventral y la corteza cerebral expresan Tuj-1 pero no Dlx4. En cambio, en las neuronas del interior de las eminencias gangliónicas y las neuronas que forman la placa cortical, Dlx4 se coexpresa junto a Tuj-1. Estos resultados estarían en consonancia con lo observado en los experimentos *in vitro* de diferenciación de precursores corticales con BDNF, en los que el aumento de la expresión de Dlx4 está asociado a la adquisición de un fenotipo neural. Queda por determinar, no obstante, si la diferenciación terminal de las neuronas requiere la expresión de Dlx4, o si ésta es consecuencia de aquella.

La posible participación de Dlx4 en los procesos de diferenciación terminal o en la adquisición de un fenotipo neuronal determinado no sería ninguna novedad dentro de la familia Dlx. Recientemente, se ha demostrado que Dlx2 puede actuar de dos formas distintas durante la neurogénesis adulta de las interneuronas del bulbo olfatorio. Así, se ha mostrado que Dlx2 se expresan en los progenitores neurales existentes en la zona subependimal lateral pero no en la dorsal, siendo necesario para la neurogénesis de prácticamente la totalidad de las interneuronas provenientes de esa región. Sin embargo, más allá de su función durante el periodo inicial de la neurogénesis, se ha demostrado que Dlx2, en conjunción con Pax6, tiene un importante papel en la especificación de las neuronas periglomerulares del bulbo olfatorio generadas en edad adulta (Brill et al., 2008).

Por el momento desconocemos los mecanismos por los que Dlx4 participaría en la diferenciación terminal de las neuronas. Sin embargo, si atendemos a que su homólogo Dlx3 es capaz de interactuar con Smad6 a través de una región del amino terminal que incluye una porción del homeodominio, y de esta forma, reprimir su actividad transcripcional (Berghorn et al., 2006), puede que estos mecanismos impliquen interacciones con las proteínas Smad. En apoyo a esta hipótesis se encuentra el hecho

de que *Dlx4*, *in vitro*, también es capaz de formar un complejo con Smad6 a través de la misma región que *Dlx3* (Berghorn et al., 2006), y que *Dlx1*, durante el proceso de diferenciación hematopoyética, interaccione a través de su homeodominio con otro miembro de la familia Smad, en este caso, con Smad4 (Chiba et al., 2003). Estas evidencias son relevantes tanto en cuanto las proteínas Smad son los efectores de la señalización inducida por TGF β /BMP y está descrito que tanto BMP2 y como BMP4 son capaces de inducir la diferenciación neuronal de los progenitores corticales (Li et al., 1998; Mabie et al., 1999). Por lo tanto, *Dlx4* podría formar parte de algunos de estos mecanismos de señalización durante la neurogénesis.

No debe de extrañar que *Dlx4* pueda tener funciones relacionadas con el mantenimiento de las células progenitoras al tiempo que se asocia a procesos relacionados con la diferenciación terminal de neuronas. Existen precedentes de la capacidad de algunos factores de transcripción de tipo homeodominio de ejercer funciones diferentes aparentemente contrapuestas, una facilitando la viabilidad de células progenitoras y otra asociada a procesos de diferenciación terminal durante un mismo proceso embrionario. Por ejemplo, está demostrado que *Pdx1*, una homeoproteína que se expresa en los islotes pancreáticos, es esencial para la viabilidad de las células progenitoras endodérmicas que constituyen el primordio prepancreático, y su falta de expresión produce agenesia del páncreas (Schwitzgebel et al., 2000). Por otro lado, la expresión de *Pdx1* se reactiva hacia el final del periodo embrionario a partir del cual es esencial para el mantenimiento del fenotipo diferenciado de las células β productoras de insulina (Ahlgren et al., 1998).

Por otro lado, los estudios de la expresión de *Dlx4* descritos en esta tesis han puesto de manifiesto que la localización intracelular de *Dlx4* puede estar relacionada con su papel funcional. Así, hemos observado que *Dlx4* se localiza principalmente en el citoplasma de las células de la zona ventricular y subventricular, mientras que en las neuronas diferenciadas que expresan *Dlx4* su localización también es nuclear. Una investigación reciente ha demostrado que *Dlx4* presenta un patrón de distribución intracelular característico dentro de la familia de factores de transcripción *Dlx*, siendo el único miembro de la familia que se puede encontrar en el citoplasma celular (Coubrough and Bendall, 2006). Un estudio comparativo de las secuencias de aminoácidos de *Dlx4* y de *Dlx3* de diversos mamíferos indica que, al contrario que *Dlx3*, *Dlx4* ha sufrido un rápida divergencia que podría estar relacionada con la

capacidad de *Dlx4* de permanecer en el citoplasma y supondría la adquisición de nuevas funciones. A este respecto, se ha comprobado que en las neoplasias mamarias humanas la expresión de *Dlx4* es preferentemente citoplasmática (Man et al., 2005). Como en el SNC embrionario *Dlx4* se localiza en el citoplasma de las células progenitoras de la zona ventricular, es posible que a nivel citoplasmático *Dlx4* realice funciones relacionadas con el mantenimiento del ciclo celular. En este sentido, en experimentos *in vitro* se ha observado que la localización celular de ATBF1, otro factor de transcripción de tipo homeodominio, está asociada con la parada del ciclo celular y la diferenciación neuronal (Jung et al., 2005). Al igual que *Dlx4*, ATBF1 se expresa en el citoplasma de las progenitores que proliferan en la zona ventricular pero durante la diferenciación neuronal su expresión pasa a ser nuclear.

Durante el desarrollo del SNC, se ha observado que la expresión de un gen *Dlx* determinado está relacionada con la de su compañero con el cual se asocia en el genoma. De este modo, *Dlx1* suele expresarse junto a *Dlx2*, y *Dlx5* junto a *Dlx6*. Sin embargo, hasta el momento no hay referencias que demuestren que *Dlx3* y *Dlx4* se expresen en el SNC. En la presente tesis doctoral se han mostrado evidencias de la expresión de *Dlx4* en el SNC en desarrollo. Esto sumado al hecho de que el par génico *Dlx3-Dlx4* se encuentra regulado por una región intergénica existente entre ambos (Sumiyama et al., 2002), podría indicar la posible participación de *Dlx3* en los procesos de desarrollo neural en los que interviene *Dlx4*, algo ya descrito para sus genes ortólogos durante el desarrollo del pez cebra (Zerucha et al., 1997; Solomon and Fritz, 2002). En este sentido se ha descrito la expresión de *Dlx3* en el cerebro anterior en pollo en desarrollo (Zhu and Bendall, 2006), aunque los autores de la investigación no lograron demostrar su expresión en embriones de ratón.

En resumen, los resultados descritos en la presente tesis doctoral permiten incorporar a *Dlx4* como un nuevo miembro de la familia de los genes *Dlx* implicado en la regulación de procesos neurogénicos durante el desarrollo del SNC.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente tesis doctoral son las siguientes:

1. DREAM es necesario para la diferenciación de astrocitos inducida por PACAP en células progenitoras de la corteza cerebral fetal.
2. DREAM es necesario para la diferenciación de astrocitos regulando la sincronización entre la inhibición de la neurogénesis y estimulación de la astrogénesis *in vivo*.
3. DREAM participa en los procesos que regulan la inhibición de la formación de neuronas al final del periodo neurogénico y su carencia provoca un aumento en el número de neuronas corticales.
4. Dlx4 no interviene en la regulación del gen *gfap*.
5. La localización citoplasmática de Dlx4 se asocia a su expresión en células progenitoras de la zona ventricular del telencéfalo embrionario .
6. La expresión de Dlx4 también está asociada a la diferenciación terminal de las neuronas de la eminencias gangliónicas y de la placa cortical. Sin embargo, Dlx4 no se expresa en neuronas inmaduras en proceso de migración.

Bibliografía

- Acampora D, Merlo GR, Pairelli L, Zerega B, Postiglione MP, Mantero S, Bober E, Barbieri O, Simeone A, Levi G (1999) Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*. *Development* 126:3795-3809.
- Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H (1998) beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12:1763-1768.
- Allendoerfer KL, Shatz CJ (1994) The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annu Rev Neurosci* 17:185-218.
- Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137:433-457.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997a) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278:474-476.
- Anderson SA, Marín O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128:353-363.
- Anderson SA, Kaznowski CE, Horn C, Rubenstein JL, McConnell SK (2002) Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in vivo. *Cereb Cortex* 12:702-709.
- Anderson SA, Qiu M, Bulfone A, Eisenstat DD, Meneses J, Pedersen R, Rubenstein JL (1997b) Mutations of the homeobox genes *Dlx-1* and *Dlx-2* disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* 19:27-37.
- Angelastro JM, Mason JL, Ignatova TN, Kukekov VG, Stengren GB, Goldman JE, Greene LA (2005) Downregulation of activating transcription factor 5 is required for differentiation of neural progenitor cells into astrocytes. *J Neurosci* 25:3889-3899.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284:770-776.
- Austin CP, Cepko CL (1990) Cellular migration patterns in the developing mouse cerebral cortex. *Development* 110:713-732.

- Backman M, Machon O, Mygland L, van den Bout CJ, Zhong W, Taketo MM, Krauss S (2005) Effects of canonical Wnt signaling on dorso-ventral specification of the mouse telencephalon. *Dev Biol* 279:155-168.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1:549-553.
- Barnabe-Heider F, Miller FD (2003) Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci* 23:5149-5160.
- Barnabe-Heider F, Wasylnka JA, Fernandes KJ, Porsche C, Sendtner M, Kaplan DR, Miller FD (2005) Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1. *Neuron* 48:253-265.
- Barres BA, Lazar MA, Raff MC (1994) A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development* 120:1097-1108.
- Bayer SA, Altman, J. (1991) Neocortical development.
- Bedford FK, Julius D, Ingraham HA (1998) Neuronal expression of the 5HT3 serotonin receptor gene requires nuclear factor 1 complexes. *J Neurosci* 18:6186-6194.
- Belikov S, Holmqvist PH, Astrand C, Wrangé O (2004) Nuclear factor 1 and octamer transcription factor 1 binding preset the chromatin structure of the mouse mammary tumor virus promoter for hormone induction. *J Biol Chem* 279:49857-49867.
- Bentivoglio M, Mazzarello P (1999) The history of radial glia. *Brain Res Bull* 49:305-315.
- Berghorn KA, Clark-Campbell PA, Han L, McGrattan M, Weiss RS, Roberson MS (2006) Smad6 represses *Dlx3* transcriptional activity through inhibition of DNA binding. *J Biol Chem* 281:20357-20367.
- Bergsland M, Werme M, Malewicz M, Perlmann T, Muhr J (2006) The establishment of neuronal properties is controlled by *Sox4* and *Sox11*. *Genes Dev* 20:3475-3486.
- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates *trk* and *trkB*. *Neuron* 7:857-866.

- Berninger B, Guillemot F, Gotz M (2007) Directing neurotransmitter identity of neurones derived from expanded adult neural stem cells. *Eur J Neurosci* 25:2581-2590.
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3:517-530.
- Bishop KM, Rubenstein JL, O'Leary DD (2002) Distinct actions of Emx1, Emx2, and Pax6 in regulating the specification of areas in the developing neocortex. *J Neurosci* 22:7627-7638.
- Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, Stahl N, Yancopoulos GD, Greenberg ME (1997) Regulation of Gliogenesis in the Central Nervous System by the JAK-STAT Signaling Pathway. *Science* 278:477-483.
- Bos JL (2003) Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:733-738.
- Braunewell KH, Gundelfinger ED (1999) Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res* 295:1-12.
- Brill MS, Snapyan M, Wohlfrom H, Ninkovic J, Jawerka M, Mastick GS, Ashery-Padan R, Saghatelian A, Berninger B, Gotz M (2008) A dlx2- and pax6-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 28:6439-6452.
- Bulfone A, Kim HJ, Puellas L, Porteus MH, Grippo JF, Rubenstein JL (1993) The mouse *Dlx-2* (*Tes-1*) gene is expressed in spatially restricted domains of the forebrain, face and limbs in midgestation mouse embryos. *Mech Dev* 40:129-140.
- Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J (2003) Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci* 6:1162-1168.
- Cai L, Morrow EM, Cepko CL (2000) Misexpression of basic helix-loop-helix genes in the murine cerebral cortex affects cell fate choices and neuronal survival. *Development* 127:3021-3030.
- Campbell K, Gotz M (2002) Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 25:235-238.

- Carey RG, Li B, DiCicco-Bloom E (2002) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide anti-mitogenic signaling in cerebral cortical progenitors is regulated by p57Kip2-dependent CDK2 activity. *J Neurosci* 22:1583-1591.
- Carrión AM, Mellstrom B, Luckman SM, Naranjo JR (1998) Stimulus-specific hierarchy of enhancer elements within the rat prodynorphin promoter. *J Neurochem* 70:914-921.
- Carrión AM, Link WA, Ledo F, Mellstrom B, Naranjo JR (1999) DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* 398:80-84.
- Cavanagh JF, Mione MC, Pappas IS, Parnavelas JG (1997) Basic fibroblast growth factor prolongs the proliferation of rat cortical progenitor cells in vitro without altering their cell cycle parameters. *Cereb Cortex* 7:293-302.
- Caviness (1976) Patterns of cell and fiber distribution in the neocortex of the reeler mutant mouse. *The Journal of comparative neurology* 170:435-447.
- Cebolla B, Vallejo M (2006) Nuclear factor-I regulates glial fibrillary acidic protein gene expression in astrocytes differentiated from cortical precursor cells. *J Neurochem* 97:1057-1070.
- Cebolla B, Fernandez-Perez A, Perea G, Araque A, Vallejo M (2008) DREAM mediates cAMP-dependent, Ca²⁺-induced stimulation of GFAP gene expression and regulates cortical astrogliogenesis. *J Neurosci* 28:6703-6713.
- Chanas-Sacre G, Thiry M, Pirard S, Rogister B, Moonen G, Mbebi C, Verdiere-Sahuque M, Leprince P (2000) A 295-kDa intermediate filament-associated protein in radial glia and developing muscle cells in vivo and in vitro. *Dev Dyn* 219:514-525.
- Chang MY, Son H, Lee YS, Lee SH (2003) Neurons and astrocytes secrete factors that cause stem cells to differentiate into neurons and astrocytes, respectively. *Mol Cell Neurosci* 23:414-426.
- Chase MB, Fu S, Haga SB, Davenport G, Stevenson H, Do K, Morgan D, Mah AL, Berg PE (2002) BP1, a homeodomain-containing isoform of DLX4, represses the beta-globin gene. *Mol Cell Biol* 22:2505-2514.
- Chaudhry AZ, Lyons GE, Gronostajski RM (1997) Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development. *Dev Dyn* 208:313-325.
- Chen D, Zhao M, Harris SE, Mi Z (2004) Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front Biosci* 9:349-358.

- Cheng HY, Pitcher GM, Laviolette SR, Wishaw IQ, Tong KI, Kockeritz LK, Wada T, Joza NA, Crackower M, Goncalves J, Sarosi I, Woodgett JR, Oliveira-dos-Santos AJ, Ikura M, van der Kooy D, Salter MW, Penninger JM (2002) DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation. *Cell* 108:31-43.
- Chenn A, Walsh CA (2003) Increased neuronal production, enlarged forebrains and cytoarchitectural distortions in beta-catenin overexpressing transgenic mice. *Cereb Cortex* 13:599-606.
- Chiaramello S, Dalmaso G, Bezin L, Marcel D, Jourdan F, Peretto P, Fasolo A, De Marchis S (2007) BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci* 26:1780-1790.
- Chiba S, Takeshita K, Imai Y, Kumano K, Kurokawa M, Masuda S, Shimizu K, Nakamura S, Ruddle FH, Hirai H (2003) Homeoprotein DLX-1 interacts with Smad4 and blocks a signaling pathway from activin A in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15577-15582.
- Cobos I, Puelles L, Martinez S (2001) The avian telencephalic subpallium originates inhibitory neurons that invade tangentially the pallium (dorsal ventricular ridge and cortical areas). *Dev Biol* 239:30-45.
- Cobos I, Borello U, Rubenstein JL (2007) Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron* 54:873-888.
- Cohen S (1959) Purification and metabolic effects of a nerve growth-promoting protein from snake venom. *J Biol Chem* 234:1129-1137.
- Cohen S, Levi-Montalcini R (1956) A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Snake Venom. *Proc Natl Acad Sci U S A* 42:571-574.
- Corbin JG, Gaiano N, Machold RP, Langston A, Fishell G (2000) The Gsh2 homeodomain gene controls multiple aspects of telencephalic development. *Development* 127:5007-5020.
- Coubrough ML, Bendall AJ (2006) Impaired nuclear import of mammalian Dlx4 proteins as a consequence of rapid sequence divergence. *Exp Cell Res* 312:3880-3891.
- Davideau JL, Demri P, Hotton D, Gu TT, MacDougall M, Sharpe P, Forest N, Berdal A (1999) Comparative study of MSX-2, DLX-5, and DLX-7 gene expression during early human tooth development. *Pediatr Res* 46:650-656.

- De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F (1996) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16:6146-6156.
- Deisseroth K, Singla S, Toda H, Monje M, Palmer TD, Malenka RC (2004) Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42:535-552.
- Deneen B, Ho R, Lukaszewicz A, Hochstim CJ, Gronostajski RM, Anderson DJ (2006) The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord. *Neuron* 52:953-968.
- Depew MJ, Lufkin T, Rubenstein JL (2002) Specification of jaw subdivisions by Dlx genes. *Science* 298:381-385.
- Depew MJ, Liu JK, Long JE, Presley R, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL (1999) Dlx5 regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Development* 126:3831-3846.
- Dolle P, Price M, Duboule D (1992) Expression of the murine Dlx-1 homeobox gene during facial, ocular and limb development. *Differentiation* 49:93-99.
- Edmondson JC, Hatten ME (1987) Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J Neurosci* 7:1928-1934.
- Eisenstat DD, Liu JK, Mione M, Zhong W, Yu G, Anderson SA, Ghattas I, Puellas L, Rubenstein JL (1999) DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of basal forebrain differentiation. *J Comp Neurol* 414:217-237.
- Ernfors P, Ibanez CF, Ebendal T, Olson L, Persson H (1990) Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5454-5458.
- Fan G, Martinowich K, Chin MH, He F, Fouse SD, Hutnick L, Hattori D, Ge W, Shen Y, Wu H, ten Hoeve J, Shuai K, Sun YE (2005) DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development* 132:3345-3356.
- Farah MH, Olson JM, Sucic HB, Hume RI, Tapscott SJ, Turner DL (2000) Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* 127:693-702.
- Feng L, Heintz N (1995) Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. *Development* 121:1719-1730.

- Ferrari N, Paleari L, Palmisano GL, Tammaro P, Levi G, Albin A, Brigati C (2003) Induction of apoptosis by fenretinide in tumor cell lines correlates with DLX2, DLX3 and DLX4 gene expression. *Oncol Rep* 10:973-977.
- Fitzgerald EM (2000) Regulation of voltage-dependent calcium channels in rat sensory neurones involves a Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Physiol* 527 Pt 3:433-444.
- Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, Birchmeier C, Lai C, Rubenstein JL, Marín O (2004) Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44:251-261.
- Fu S, Stevenson H, Strovel JW, Haga SB, Stamberg J, Do K, Berg PE (2001) Distinct functions of two isoforms of a homeobox gene, BP1 and DLX7, in the regulation of the beta-globin gene. *Gene* 278:131-139.
- Fu SW, Schwartz A, Stevenson H, Pinzone JJ, Davenport GJ, Orenstein JM, Gutierrez P, Simmens SJ, Abraham J, Poola I, Stephan DA, Berg PE (2003) Correlation of expression of BP1, a homeobox gene, with estrogen receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res* 5:R82-87.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Gage FH, Ray J, Fisher LJ (1995) Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* 18:159-192.
- Gaiano N, Nye JS, Fishell G (2000) Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26:395-404.
- Gaudilliere B, Konishi Y, de la Iglesia N, Yao G, Bonni A (2004) A CaMKII-NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis. *Neuron* 41:229-241.
- Ge W, Martinowich K, Wu X, He F, Miyamoto A, Fan G, Weinmaster G, Sun YE (2002) Notch signaling promotes astroglialogenesis via direct CSL-mediated glial gene activation. *J Neurosci Res* 69:848-860.
- Ghosh A, Greenberg ME (1995) Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* 15:89-103.
- Gomez-Villafuertes R, Torres B, Barrio J, Savignac M, Gabellini N, Rizzato F, Pintado B, Gutierrez-Adan A, Mellstrom B, Carafoli E, Naranjo JR (2005) Downstream regulatory element antagonist modulator regulates Ca²⁺ homeostasis and viability in cerebellar neurons. *J Neurosci* 25:10822-10830.
- Gotz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:777-788.

- Gotz M, Hartfuss E, Malatesta P (2002) Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res Bull* 57:777-788.
- Gray PA et al. (2004) Mouse brain organization revealed through direct genome-scale TF expression analysis. *Science* 306:2255-2257.
- Gregory WA, Edmondson JC, Hatten ME, Mason CA (1988) Cytology and neuron-glial apposition of migrating cerebellar granule cells in vitro. *J Neurosci* 8:1728-1738.
- Gritli-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang XM, Linde A, McMahon AP (2002) Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development* 129:5323-5337.
- Gronostajski RM (2000) Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene* 249:31-45.
- Gross RE, Mehler MF, Mabie PC, Zang Z, Santschi L, Kessler JA (1996) Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 17:595-606.
- Haga SB, Fu S, Karp JE, Ross DD, Williams DM, Hankins WD, Behm F, Ruscetti FW, Chang M, Smith BD, Becton D, Raimondi SC, Berg PE (2000) BP1, a new homeobox gene, is frequently expressed in acute leukemias. *Leukemia* 14:1867-1875.
- Hand R, Bortone D, Mattar P, Nguyen L, Heng JI, Guerrier S, Boutt E, Peters E, Barnes AP, Parras C, Schuurmans C, Guillemot F, Polleux F (2005) Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* 48:45-62.
- Hara F, Samuel S, Liu J, Rosen D, Langley RR, Naora H (2007) A homeobox gene related to *Drosophila* distal-less promotes ovarian tumorigenicity by inducing expression of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2. *Am J Pathol* 170:1594-1606.
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* 229:15-30.
- Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, Ookawara S, Fujioka M, Guillemot F, Kageyama R (2004) Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* 131:5539-5550.

- Hatten ME (2002) New directions in neuronal migration. *Science* 297:1660-1663.
- He F, Ge W, Martinowich K, Becker-Catania S, Coskun V, Zhu W, Wu H, Castro D, Guillemot F, Fan G, de Vellis J, Sun YE (2005) A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astrogliogenesis. *Nat Neurosci* 8:616-625.
- Helms AW, Johnson JE (2003) Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Curr Opin Neurobiol* 13:42-49.
- Hermanson O, Jepsen K, Rosenfeld MG (2002) N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature* 419:934-939.
- Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, Nakajima K, Akiyama T, Masuyama N, Gotoh Y (2004) The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 131:2791-2801.
- Hockfield S, McKay RD (1985) Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 5:3310-3328.
- Hollington P, Neufing P, Kalionis B, Waring P, Bentel J, Wattchow D, Tilley WD (2004) Expression and localization of homeodomain proteins DLX4, HB9 and HB24 in malignant and benign human colorectal tissues. *Anticancer Res* 24:955-962.
- Ip NY, Ibanez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, Belluscio L, Le Beau MM, Espinosa R, 3rd, Squinto SP, et al. (1992) Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3060-3064.
- Israsena N, Hu M, Fu W, Kan L, Kessler JA (2004) The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. *Dev Biol* 268:220-231.
- Jacobson M (1991) *Developmental neurobiology*, 3rd Edition. New York: Plenum Press.
- Jaworski DM, Proctor MD (2000) Developmental regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and PAC(1) receptor mRNA expression in the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 120:27-39.
- Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1:20-29.

- Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD (1996) Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 10:3129-3140.
- Jung CG, Kim HJ, Kawaguchi M, Khanna KK, Hida H, Asai K, Nishino H, Miura Y (2005) Homeotic factor ATBF1 induces the cell cycle arrest associated with neuronal differentiation. *Development* 132:5137-5145.
- Kalkhoven E (2004) CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol* 68:1145-1155.
- Kirschenbaum B, Goldman SA (1995) Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:210-214.
- Koblar SA, Turnley AM, Classon BJ, Reid KL, Ware CB, Cheema SS, Murphy M, Bartlett PF (1998) Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3178-3181.
- Kriegstein AR, Gotz M (2003) Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 43:37-43.
- Krohn K, Rozovsky I, Wals P, Teter B, Anderson CP, Finch CE (1999) Glial fibrillary acidic protein transcription responses to transforming growth factor-beta1 and interleukin-1beta are mediated by a nuclear factor-1-like site in the near-upstream promoter. *J Neurochem* 72:1353-1361.
- Lastres-Becker I, Fernández-Pérez A, Cebolla B, Vallejo M (2008) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates glial fibrillary acidic protein gene expression in cortical precursor cells by activating Ras and Rap1. *Molecular and Cellular Neuroscience* (En prensa).
- Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19:7881-7888.
- Le TN, Du G, Fonseca M, Zhou QP, Wigle JT, Eisenstat DD (2007) Dlx homeobox genes promote cortical interneuron migration from the basal forebrain by direct repression of the semaphorin receptor neuropilin-2. *J Biol Chem* 282:19071-19081.
- Ledo F, Link WA, Carrión AM, Echeverria V, Mellstrom B, Naranjo JR (2000) The DREAM-DRE interaction: key nucleotides and dominant negative mutants. *Biochim Biophys Acta* 1498:162-168.

- Lee SK, Pfaff SL (2003) Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. *Neuron* 38:731-745.
- Lefevre P, Melnik S, Wilson N, Riggs AD, Bonifer C (2003) Developmentally regulated recruitment of transcription factors and chromatin modification activities to chicken lysozyme cis-regulatory elements in vivo. *Mol Cell Biol* 23:4386-4400.
- Levitt P, Rakic P (1980) Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* 193:815-840.
- Li JY, Joyner AL (2001) Otx2 and Gbx2 are required for refinement and not induction of mid-hindbrain gene expression. *Development* 128:4979-4991.
- Li W, Cogswell CA, LoTurco JJ (1998) Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by BMP. *J Neurosci* 18:8853-8862.
- Link WA, Ledo F, Torres B, Palczewska M, Madsen TM, Savignac M, Albar JP, Mellstrom B, Naranjo JR (2004) Day-night changes in downstream regulatory element antagonist modulator/potassium channel interacting protein activity contribute to circadian gene expression in pineal gland. *J Neurosci* 24:5346-5355.
- Liu JK, Ghattas I, Liu S, Chen S, Rubenstein JL (1997) Dlx genes encode DNA-binding proteins that are expressed in an overlapping and sequential pattern during basal ganglia differentiation. *Dev Dyn* 210:498-512.
- Liu M, Pleasure SJ, Collins AE, Noebels JL, Naya FJ, Tsai MJ, Lowenstein DH (2000) Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:865-870.
- Livesey FJ, Hunt SP (1997) Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral, and cerebellar development. *Mol Cell Neurosci* 8:417-429.
- Lopez-Bendito G, Sanchez-Alcaniz JA, Pla R, Borrell V, Pico E, Valdeolmillos M, Marín O (2008) Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. *J Neurosci* 28:1613-1624.
- Lopez-Bendito G, Cautinat A, Sanchez JA, Bielle F, Flames N, Garratt AN, Talmage DA, Role LW, Charnay P, Marín O, Garel S (2006) Tangential neuronal

- migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell* 125:127-142.
- Lu N, DiCicco-Bloom E (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an autocrine inhibitor of mitosis in cultured cortical precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3357-3362.
- Ma YC, Song MR, Park JP, Henry Ho HY, Hu L, Kurtev MV, Zieg J, Ma Q, Pfaff SL, Greenberg ME (2008) Regulation of motor neuron specification by phosphorylation of neurogenin 2. *Neuron* 58:65-77.
- Mabie PC, Mehler MF, Kessler JA (1999) Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype. *J Neurosci* 19:7077-7088.
- Machon O, van den Bout CJ, Backman M, Kemler R, Krauss S (2003) Role of beta-catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium. *Neuroscience* 122:129-143.
- Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127:5253-5263.
- Man YG, Fu SW, Schwartz A, Pinzone JJ, Simmens SJ, Berg PE (2005) Expression of BP1, a novel homeobox gene, correlates with breast cancer progression and invasion. *Breast Cancer Res Treat* 90:241-247.
- Marín O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2:780-790.
- Marín O, Rubenstein JL (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26:441-483.
- Marín O, Anderson SA, Rubenstein JL (2000) Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci* 20:6063-6076.
- Marín O, Valdeolmillos M, Moya F (2006) Neurons in motion: same principles for different shapes? *Trends Neurosci* 29:655-661.
- Mason CA, Edmondson JC, Hatten ME (1988) The extending astroglial process: development of glial cell shape, the growing tip, and interactions with neurons. *J Neurosci* 8:3124-3134.
- Matter-Sadzinski L, Puzianowska-Kuznicka M, Hernandez J, Ballivet M, Matter JM (2005) A bHLH transcriptional network regulating the specification of retinal ganglion cells. *Development* 132:3907-3921.
- McKay R (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:66-71.

- McManus MF, Chen LC, Vallejo I, Vallejo M (1999) Astroglial differentiation of cortical precursor cells triggered by activation of the cAMP-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 19:9004-9015.
- Miller FD, Gauthier AS (2007) Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 54:357-369.
- Misson JP, Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS, Jr. (1988) Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Res Dev Brain Res* 44:95-108.
- Misson JP, Austin CP, Takahashi T, Cepko CL, Caviness VS, Jr. (1991) The alignment of migrating neural cells in relation to the murine neopallial radial glial fiber system. *Cereb Cortex* 1:221-229.
- Miyata T, Maeda T, Lee JE (1999) NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev* 13:1647-1652.
- Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M (2001) Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31:727-741.
- Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, Yoshida S, Nabeshima Y, Shimamura K, Nakafuku M (2001) Combinatorial roles of *olig2* and *neurogenin2* in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* 31:757-771.
- Mizutani K, Saito T (2005) Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex. *Development* 132:1295-1304.
- Molne M, Studer L, Tabar V, Ting YT, Eiden MV, McKay RD (2000) Early cortical precursors do not undergo LIF-mediated astrocytic differentiation. *J Neurosci Res* 59:301-311.
- Morin X, Cremer H, Hirsch MR, Kapur RP, Goridis C, Brunet JF (1997) Defects in sensory and autonomic ganglia and absence of locus coeruleus in mice deficient for the homeobox gene *Phox2a*. *Neuron* 18:411-423.
- Morrow T, Song MR, Ghosh A (2001) Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors. *Development* 128:3585-3594.
- Nakada Y, Hunsaker TL, Henke RM, Johnson JE (2004) Distinct domains within *Mash1* and *Math1* are required for function in neuronal differentiation versus neuronal cell-type specification. *Development* 131:1319-1330.

- Nakamura S, Stock DW, Wydner KL, Bollekens JA, Takeshita K, Nagai BM, Chiba S, Kitamura T, Freeland TM, Zhao Z, Minowada J, Lawrence JB, Weiss KM, Ruddle FH (1996) Genomic analysis of a new mammalian distal-less gene: *Dlx7*. *Genomics* 38:314-324.
- Nakamura Y, Sakakibara S, Miyata T, Ogawa M, Shimazaki T, Weiss S, Kageyama R, Okano H (2000) The bHLH gene *hes1* as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J Neurosci* 20:283-293.
- Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, Taga T (1999a) Astrocyte differentiation mediated by LIF in cooperation with BMP2. *FEBS Lett* 457:43-46.
- Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, Kimura N, Hisatsune T, Kawabata M, Miyazono K, Taga T (1999b) Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284:479-482.
- Nakashima K, Wiese S, Yanagisawa M, Arakawa H, Kimura N, Hisatsune T, Yoshida K, Kishimoto T, Sendtner M, Taga T (1999c) Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J Neurosci* 19:5429-5434.
- Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M, Miyazono K, Kishimoto T, Kageyama R, Taga T (2001) BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5868-5873.
- Namihira M, Nakashima K, Taga T (2004) Developmental stage dependent regulation of DNA methylation and chromatin modification in a immature astrocyte specific gene promoter. *FEBS Lett* 572:184-188.
- Neufing PJ, Kalionis B, Horsfall DJ, Ricciardelli C, Stahl J, Vivekanandan S, Raymond W, Tilley WD (2003) Expression and localization of homeodomain proteins DLX4/HB9 in normal and malignant human breast tissues. *Anticancer Res* 23:1479-1488.
- Nicot A, DiCicco-Bloom E (2001) Regulation of neuroblast mitosis is determined by PACAP receptor isoform expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4758-4763.
- Nieto M, Schuurmans C, Britz O, Guillemot F (2001) Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29:401-413.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have

- morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 22:3161-3173.
- O'Rourke NA, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK (1992) Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 258:299-302.
- Ochiai W, Yanagisawa M, Takizawa T, Nakashima K, Taga T (2001) Astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells involving cardiotrophin-1-induced activation of STAT3. *Cytokine* 14:264-271.
- Osawa M, Tong KI, Lilliehook C, Wasco W, Buxbaum JD, Cheng HY, Penninger JM, Ikura M, Ames JB (2001) Calcium-regulated DNA binding and oligomerization of the neuronal calcium-sensing protein, calsenilin/DREAM/KChIP3. *J Biol Chem* 276:41005-41013.
- Panganiban G, Rubenstein JLR (2002) Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. *Development* 129:4371-4386.
- Park JK, Williams BP, Alberta JA, Stiles CD (1999) Bipotent cortical progenitor cells process conflicting cues for neurons and glia in a hierarchical manner. *J Neurosci* 19:10383-10389.
- Parras CM, Schuurmans C, Scardigli R, Kim J, Anderson DJ, Guillemot F (2002) Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* 16:324-338.
- Parras CM, Galli R, Britz O, Soares S, Galichet C, Battiste J, Johnson JE, Nakafuku M, Vescovi A, Guillemot F (2004) Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J* 23:4495-4505.
- Pham N, Cheglakov I, Koch CA, de Hoog CL, Moran MF, Rotin D (2000) The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates ras in response to cAMP and cGMP. *Curr Biol* 10:555-558.
- Pixley SK, de Vellis J (1984) Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res* 317:201-209.
- Pla R, Borrell V, Flames N, Marín O (2006) Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling. *J Neurosci* 26:6924-6934.
- Pleasure SJ, Anderson S, Hevner R, Bagri A, Marín O, Lowenstein DH, Rubenstein JL (2000) Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron* 28:727-740.

- Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T, Ghosh A (2002) Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* 129:3147-3160.
- Porteus MH, Bulfone A, Ciaranello RD, Rubenstein JL (1991) Isolation and characterization of a novel cDNA clone encoding a homeodomain that is developmentally regulated in the ventral forebrain. *Neuron* 7:221-229.
- Price M, Lemaistre M, Pischetola M, Di Lauro R, Duboule D (1991) A mouse gene related to Distal-less shows a restricted expression in the developing forebrain. *Nature* 351:748-751.
- Qiu M, Bulfone A, Martinez S, Meneses JJ, Shimamura K, Pedersen RA, Rubenstein JL (1995) Null mutation of *Dlx-2* results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain. *Genes Dev* 9:2523-2538.
- Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, Meneses JJ, Christensen L, Sharpe PT, Presley R, Pedersen RA, Rubenstein JL (1997) Role of the *Dlx* homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of *Dlx-1*, *Dlx-2*, and *Dlx-1* and *-2* alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol* 185:165-184.
- Quinn LM, Johnson BV, Nicholl J, Sutherland GR, Kalionis B (1997) Isolation and identification of homeobox genes from the human placenta including a novel member of the Distal-less family, *DLX4*. *Gene* 187:55-61.
- Quint E, Zerucha T, Ekker M (2000) Differential expression of orthologous *Dlx* genes in zebrafish and mice: implications for the evolution of the *Dlx* homeobox gene family. *J Exp Zool* 288:235-241.
- Rajan P, McKay RD (1998) Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* 18:3620-3629.
- Rajan P, Panchision DM, Newell LF, McKay RD (2003) BMPs signal alternately through a SMAD or FRAP-STAT pathway to regulate fate choice in CNS stem cells. *J Cell Biol* 161:911-921.
- Rakic P (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145:61-83.
- Rakic P (1974) Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183:425-427.

- Rakic P, Sidman RL (1969) Telencephalic origin of pulvinar neurons in the fetal human brain. *Z Anat Entwicklungsgesch* 129:53-82.
- Rao MS (1999) Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. *The Anatomical Record* 257:137-148.
- Ray J, Peterson DA, Schinstine M, Gage FH (1993) Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3602-3606.
- Richards LJ, Kilpatrick TJ, Dutton R, Tan SS, Gearing DP, Bartlett PF, Murphy M (1996) Leukaemia inhibitory factor or related factors promote the differentiation of neuronal and astrocytic precursors within the developing murine spinal cord. *Eur J Neurosci* 8:291-299.
- Robinson GW, Mahon KA (1994) Differential and overlapping expression domains of *Dlx-2* and *Dlx-3* suggest distinct roles for Distal-less homeobox genes in craniofacial development. *Mech Dev* 48:199-215.
- Robinson GW, Wray S, Mahon KA (1991) Spatially restricted expression of a member of a new family of murine Distal-less homeobox genes in the developing forebrain. *New Biol* 3:1183-1194.
- Robledo RF, Rajan L, Li X, Lufkin T (2002) The *Dlx5* and *Dlx6* homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev* 16:1089-1101.
- Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD (2003) Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* 39:13-25.
- Rowitch DH (2004) Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci* 5:409-419.
- Rubenstein JL (2000) Intrinsic and extrinsic control of cortical development. *Novartis Found Symp* 228:67-75; discussion 75-82, 109-113.
- Sandberg M, Kallstrom M, Muhr J (2005) *Sox21* promotes the progression of vertebrate neurogenesis. *Nat Neurosci* 8:995-1001.
- Scherer SW, Heng HH, Robinson GW, Mahon KA, Evans JP, Tsui LC (1995) Assignment of the human homolog of mouse *Dlx3* to chromosome 17q21.3-q22 by analysis of somatic cell hybrids and fluorescence in situ hybridization. *Mamm Genome* 6:310-311.
- Schmid RS, McGrath B, Berechid BE, Boyles B, Marchionni M, Sestan N, Anton ES (2003) Neuregulin 1-erbB2 signaling is required for the establishment of radial

- glia and their transformation into astrocytes in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4251-4256.
- Schuurmans C, Guillemot F (2002) Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr Opin Neurobiol* 12:26-34.
- Schuurmans C, Armant O, Nieto M, Stenman JM, Britz O, Klenin N, Brown C, Langevin LM, Seibt J, Tang H, Cunningham JM, Dyck R, Walsh C, Campbell K, Polleux F, Guillemot F (2004) Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *EMBO J* 23:2892-2902.
- Schwartz PT, Vallejo M (1998) Differential regulation of basal and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-induced somatostatin gene transcription in neural cells by DNA control elements that bind homeodomain proteins. *Mol Endocrinol* 12:1280-1293.
- Schwitzgebel VM, Scheel DW, Conners JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS (2000) Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127:3533-3542.
- Shibata T, Yamada K, Watanabe M, Ikenaka K, Wada K, Tanaka K, Inoue Y (1997) Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J Neurosci* 17:9212-9219.
- Shimamoto T, Ohyashiki K, Takeshita K (1999) DLX-7 homeobox gene regulates c-myc and GATA-1 gene expression in different stages respectively. *Int J Oncol* 15:307-313.
- Shimamoto T, Ohyashiki K, Takeshita K (2000) Overexpression of the homeobox gene DLX-7 inhibits apoptosis by induced expression of intercellular adhesion molecule-1. *Exp Hematol* 28:433-441.
- Simeone A, Acampora D, Pannese M, D'Esposito M, Stornaiuolo A, Gulisano M, Mallamaci A, Kastury K, Druck T, Huebner K, et al. (1994) Cloning and characterization of two members of the vertebrate Dlx gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2250-2254.
- Skaliora I, Singer W, Betz H, Puschel AW (1998) Differential patterns of semaphorin expression in the developing rat brain. *Eur J Neurosci* 10:1215-1229.
- Skoglosa Y, Takei N, Lindholm D (1999) Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA in the developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 65:1-13.

- Solomon KS, Fritz A (2002) Concerted action of two dlx paralogs in sensory placode formation. *Development* 129:3127-3136.
- Song MR, Ghosh A (2004) FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat Neurosci* 7:229-235.
- Ster J, De Bock F, Guerineau NC, Janossy A, Barrere-Lemaire S, Bos JL, Bockaert J, Fagni L (2007) Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2519-2524.
- Stevenson HS, Fu SW, Pinzone JJ, Rheey J, Simmens SJ, Berg PE (2007) BP1 transcriptionally activates bcl-2 and inhibits TNF α -induced cell death in MCF7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 9:R60.
- Stock DW, Ellies DL, Zhao Z, Ekker M, Ruddle FH, Weiss KM (1996) The evolution of the vertebrate Dlx gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10858-10863.
- Stolt CC, Lommes P, Sock E, Chaboissier MC, Schedl A, Wegner M (2003) The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev* 17:1677-1689.
- Stuhmer T, Puellas L, Ekker M, Rubenstein JL (2002a) Expression from a Dlx gene enhancer marks adult mouse cortical GABAergic neurons. *Cereb Cortex* 12:75-85.
- Stuhmer T, Anderson SA, Ekker M, Rubenstein JL (2002b) Ectopic expression of the Dlx genes induces glutamic acid decarboxylase and Dlx expression. *Development* 129:245-252.
- Suh J, Lu N, Nicot A, Tatsuno I, DiCicco-Bloom E (2001) PACAP is an anti-mitogenic signal in developing cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4:123-124.
- Sumiyama K, Irvine SQ, Stock DW, Weiss KM, Kawasaki K, Shimizu N, Shashikant CS, Miller W, Ruddle FH (2002) Genomic structure and functional control of the Dlx3-7 bigene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:780-785.
- Sumner C, Shinohara T, Durham L, Traub R, Major EO, Amemiya K (1996) Expression of multiple classes of the nuclear factor-1 family in the developing human brain: differential expression of two classes of NF-1 genes. *J Neurovirol* 2:87-100.
- Sun Y, Lu X, Yin L, Zhao F, Feng Y (2006) Inhibition of DLX4 promotes apoptosis in choriocarcinoma cell lines. *Placenta* 27:375-383.

- Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, Lin MZ, Zubiaga A, Hua X, Fan G, Greenberg ME (2001) Neurogenin Promotes Neurogenesis and Inhibits Glial Differentiation by Independent Mechanisms. *Cell* 104:365-376.
- Sussel L, Marín O, Kimura S, Rubenstein JL (1999) Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126:3359-3370.
- Takizawa T, Ochiai W, Nakashima K, Taga T (2003) Enhanced gene activation by Notch and BMP signaling cross-talk. *Nucleic Acids Res* 31:5723-5731.
- Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, Fujita N, Nakao M, Taga T (2001) DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* 1:749-758.
- Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, Tashiro K, Kurooka H, Honjo T (2001) Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* 29:45-55.
- Tatsuno I, Arimura A (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mobilizes intracellular free calcium in cultured rat type-2, but not type-1, astrocytes. *Brain Res* 662:1-10.
- Temple S, Qian X (1996) Vertebrate neural progenitor cells: subtypes and regulation. *Curr Opin Neurobiol* 6:11-17.
- Toma JG, El-Bizri H, Barnabe-Heider F, Aloyz R, Miller FD (2000) Evidence that helix-loop-helix proteins collaborate with retinoblastoma tumor suppressor protein to regulate cortical neurogenesis. *J Neurosci* 20:7648-7656.
- Tomida S, Yanagisawa K, Koshikawa K, Yatabe Y, Mitsudomi T, Osada H, Takahashi T (2007) Identification of a metastasis signature and the DLX4 homeobox protein as a regulator of metastasis by combined transcriptome approach. *Oncogene* 26:4600-4608.
- Tomita K, Moriyoshi K, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R (2000) Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *EMBO J* 19:5460-5472.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47:803-815.

- Vallejo I, Vallejo M (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces astrocyte differentiation of precursor cells from developing cerebral cortex. *Mol Cell Neurosci* 21:671-683.
- Vicario-Abejon C, Johe KK, Hazel TG, Collazo D, McKay RD (1995) Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons. *Neuron* 15:105-114.
- Vicent GP, Nacht AS, Smith CL, Peterson CL, Dimitrov S, Beato M (2004) DNA instructed displacement of histones H2A and H2B at an inducible promoter. *Mol Cell* 16:439-452.
- Walsh C, Cepko CL (1992) Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science* 255:434-440.
- Wang W, Stock RE, Gronostajski RM, Wong YW, Schachner M, Kilpatrick DL (2004) A role for nuclear factor I in the intrinsic control of cerebellar granule neuron gene expression. *J Biol Chem* 279:53491-53497.
- Ware CB, Horowitz MC, Renshaw BR, Hunt JS, Liggitt D, Koblar SA, Gliniak BC, McKenna HJ, Papayannopoulou T, Thoma B, et al. (1995) Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development* 121:1283-1299.
- Weiss KM, Ruddle FH, Bollekens J (1995) *Dlx* and other homeobox genes in the morphological development of the dentition. *Connect Tissue Res* 32:35-40.
- Weiss KM, Bollekens J, Ruddle FH, Takashita K (1994) *Distal-less* and other homeobox genes in the development of the dentition. *J Exp Zool* 270:273-284.
- Williams BP, Park JK, Alberta JA, Muhlebach SG, Hwang GY, Roberts TM, Stiles CD (1997) A PDGF-regulated immediate early gene response initiates neuronal differentiation in ventricular zone progenitor cells. *Neuron* 18:553-562.
- Yanagisawa M, Takizawa T, Ochiai W, Uemura A, Nakashima K, Taga T (2001) Fate alteration of neuroepithelial cells from neurogenesis to astrocytogenesis by bone morphogenetic proteins. *Neurosci Res* 41:391-396.
- Yang L, Zhang H, Hu G, Wang H, Abate-Shen C, Shen MM (1998) An early phase of embryonic *Dlx5* expression defines the rostral boundary of the neural plate. *J Neurosci* 18:8322-8330.

- Yuan W, Zhou L, Chen JH, Wu JY, Rao Y, Ornitz DM (1999) The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Dev Biol* 212:290-306.
- Yun K, Potter S, Rubenstein JL (2001) Gsh2 and Pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development* 128:193-205.
- Zerucha T, Ekker M (2000) Distal-less-related homeobox genes of vertebrates: evolution, function, and regulation. *Biochem Cell Biol* 78:593-601.
- Zerucha T, Muller JP, Chartrand N, Ekker M (1997) Cross-interactions between two members of the Dlx family of homeobox-containing genes during zebrafish development. *Biochem Cell Biol* 75:613-622.
- Zerucha T, Stuhmer T, Hatch G, Park BK, Long Q, Yu G, Gambarotta A, Schultz JR, Rubenstein JL, Ekker M (2000) A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between Dlx genes in the embryonic forebrain. *J Neurosci* 20:709-721.
- Zhao Z, Stock D, Buchanan A, Weiss K (2000) Expression of Dlx genes during the development of the murine dentition. *Dev Genes Evol* 210:270-275.
- Zhu H, Bendall AJ (2006) Dlx3 is expressed in the ventral forebrain of chicken embryos: implications for the evolution of the Dlx gene family. *Int J Dev Biol* 50:71-75.
- Zupan V, Hill JM, Brenneman DE, Gozes I, Fridkin M, Robberecht P, Evrard P, Gressens P (1998) Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide II vasoactive intestinal peptide 2 receptor in mouse neocortical astrocytogenesis. *J Neurochem* 70:2165-2173.

Anexo I:
Publicaciones directamente derivadas
de la Tesis

DREAM Mediates cAMP-Dependent, Ca^{2+} -Induced Stimulation of GFAP Gene Expression and Regulates Cortical Astroglialogenesis

Beatriz Cebolla,^{1*} Antonio Fernández-Pérez,^{1*} Gertrudis Perea,² Alfonso Araque,² and Mario Vallejo¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain, and ²Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28002 Madrid, Spain

In the developing mouse brain, once the generation of neurons is mostly completed during the prenatal period, precisely coordinated signals act on competent neural precursors to direct their differentiation into astrocytes, which occurs mostly after birth. Among these signals, those provided by neurotrophic cytokines and bone morphogenetic proteins appear to have a key role in triggering the neurogenic to gliogenic switch and in regulating astrocyte numbers. In addition, we have reported previously that the neurotrophic peptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is able to promote astrocyte differentiation of cortical precursors via activation of a cAMP-dependent pathway. Signals acting on progenitor cells of the developing cortex to generate astrocytes activate glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene expression, but the transcriptional mechanisms that regulate this activation are unclear. Here, we identify the previously known transcriptional repressor downstream regulatory element antagonist modulator (DREAM) as an activator of GFAP gene expression. We found that DREAM occupies specific sites on the GFAP promoter before and after differentiation is initiated by exposure of cortical progenitor cells to PACAP. PACAP raises intracellular calcium concentration via a mechanism that requires cAMP, and DREAM-mediated transactivation of the GFAP gene requires the integrity of calcium-binding domains. Cortical progenitor cells from *dream*^{-/-} mice fail to express GFAP in response to PACAP. Moreover, the neonatal cortex of *dream*^{-/-} mice exhibits a reduced number of astrocytes and increased number of neurons. These results identify the PACAP-cAMP- Ca^{2+} -DREAM cascade as a new pathway to activate GFAP gene expression during astrocyte differentiation.

Key words: glial fibrillary acidic protein; DREAM; gliogenesis; cAMP; calcium; transcription

Introduction

In the developing mammalian CNS, the generation of astrocytes from neural progenitor cells occurs mostly during the early postnatal period once neurogenesis is completed (Qian et al., 2000; Sauvageot and Stiles, 2002). This is attributable, in part, to the existence of mechanisms that actively prevent the differentiation of astrocytes during the neurogenic period, even in the presence of astroglial signals (Park et al., 1999; Nieto et al., 2001; Sun et al., 2001; Takizawa et al., 2001; Hermanson et al., 2002; Nami-hira et al., 2004; Angelastro et al., 2005). The capacity of neural precursors to switch from neurogenesis to gliogenesis is favored by certain extracellular factors (Qian et al., 1997; Viti et al., 2003)

as well as by induced chromatin remodeling of gliogenic genes (Song and Ghosh, 2004; Fan et al., 2005).

Whether neural progenitor cells generate neurons or astrocytes also depends on the type of extracellular signals to which they are exposed. Thus, it has been shown that the differentiation of astrocytes is triggered by cytokines such as ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor or cardiotrophin-1, by bone morphogenetic proteins (BMPs), or by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) (Gross et al., 1996; Bonni et al., 1997; Rajan and McKay, 1998; Vallejo and Vallejo, 2002; Barnabé-Heider et al., 2005; Cebolla and Vallejo, 2006).

Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), which provides a phenotypic marker characteristic of astrocytes, is induced by activation of intracellular signaling mechanisms that directly stimulate GFAP gene transcription. Thus, neurotrophic cytokines activate Janus kinases (JAKs) at their receptors, resulting in the phosphorylation and nuclear translocation of signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins, which in turn act at specific regulatory sites of the GFAP gene promoter (Johe et al., 1996; Bonni et al., 1997; Koblar et al., 1998; Rajan and McKay, 1998; Park et al., 1999; He et al., 2005). However, the signaling pathways activated by BMP involve the activation of Smad proteins, which then translocate to the nucleus to stimulate

Received Jan. 17, 2008; revised May 12, 2008; accepted May 20, 2008.

This work was supported by Community of Madrid Grant 08.5/0028/2001 and Spanish Ministry of Education and Science Grants BMC2002-00870 and BFU2005-02052 (M.V.) and BFU2007-64764 (A.A.). B.C., A.F.-P., and G.P. were supported by predoctoral fellowships from the Community of Madrid, The Spanish Ministry of Education and Science, and the Consejo Superior de Investigaciones Científicas, respectively. We thank Dr. J. R. Naranjo for providing antisera and expression plasmids encoding different versions of DREAM, Dr. J. M. Penninger for providing DREAM-deficient mice, and Dr. A. Perez-Castillo for advice with neurosphere cultures.

*B.C. and A.F.-P. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to Dr. Mario Vallejo, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Calle Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. E-mail: mvallejo@iib.uam.es.

B. Cebolla's present address: Health Consumer Powerhouse, Rue Fossé au Loups 34, 1000 Brussels, Belgium.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0215-08.2008

Copyright © 2008 Society for Neuroscience 0270-6474/08/286703-11\$15.00/0

GFAP gene transcription (Gross et al., 1996; Mehler et al., 1997; Mabie et al., 1999; Nakashima et al., 1999).

Previous work in our laboratory led to the identification of an additional intracellular signaling mechanism for the generation of astrocytes that involves activation of a cAMP-dependent pathway (McManus et al., 1999; Vallejo and Vallejo, 2002). This mechanism is activated by PACAP, which promotes astrocyte differentiation without influencing neuronal or oligodendroglial lineages by acting on specific PACAP type 1 (PAC1) receptors to induce the synthesis of cAMP in cortical precursor cells. In turn, activation of a cAMP-dependent signaling system is required for astroglialogenesis induced by this peptide (Vallejo and Vallejo, 2002). However, the molecular mechanism by which PACAP and cAMP stimulate GFAP gene expression and induce astroglialogenesis *in vivo* are unknown. In the present study, we identified the requirement of transcription factor downstream regulatory element antagonist modulator (DREAM) bound to the GFAP promoter as a major effector of this response, and we demonstrate that DREAM responds to cAMP-dependent increases in intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) to stimulate expression of GFAP in cortical progenitor cells.

Materials and Methods

Plasmids. Luciferase reporter plasmids for the rat GFAP gene promoter have been described previously (Bonni et al., 1997; Krohn et al., 1999; Cebolla and Vallejo, 2006). DRE1 and DRE2 sites in GFAP-A7Luc were mutated by oligonucleotide directed mutagenesis using *Pfu Turbo* DNA polymerase from a QuikChange kit (Stratagene) and the following primers: DRE1 mutant, 5'-CAAGTATGCACGCGTAAACAGGCCT-3'; and DRE2 mutant, 5'-GCCAGGACTGCAGGGGAGATCCAGT-3'. Expression vectors encoding DREAM (Carrión et al., 1999; Ledo et al., 2000a) were provided by Dr. J. R. Naranjo [Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain].

Cell culture and transfections. Primary cortical cell cultures from the cerebral cortex from fetal brains of embryonic day 17 (E17) Wistar rats or E16 mice were prepared as described previously (Vallejo and Vallejo, 2002; Cebolla and Vallejo, 2006). Cells were seeded in serum-free DMEM containing N1 supplement (Sigma) and 1 mM sodium pyruvate (defined medium), as well as 20 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (PeproTech) at a density of $2\text{--}4 \times 10^4$ cells/cm², and were expanded at 37°C for 3–4 d. Medium was replaced every 2 d. Differentiation experiments were performed as described (Vallejo and Vallejo, 2002; Cebolla and Vallejo, 2006). Cells (4×10^4 cells/cm²) were plated into 35 mm dishes and incubated at 37°C. After 24 h, bFGF-containing medium was replaced with bFGF-free defined medium, and PACAP (100 nM) or CNTF (50 ng/ml) was immediately added.

Transfections of primary cortical precursor cells prepared from E17 Wistar rat fetuses have been described in detail (Cebolla and Vallejo, 2006). Cells were incubated with 6 μg of reporter plasmid DNA mixed with 10 μl of FuGENE 6 transfection reagent (Roche) in defined medium for 4 h. Expression vectors encoding DREAM were used at 1 μg unless stated otherwise, and total DNA amount was kept constant in all transfections by adding empty vector when necessary. The medium-DNA mix was removed and substituted with fresh defined medium, or with defined medium containing PACAP (100 nM) or 8Br-cAMP (1 mM). In experiments with the calcium ionophore A23187 (0.02 μM), cells were treated for 15–20 min 24 h after transfections. Luciferase activity was determined with a commercial assay system (Promega) 48 h after transfection. Luciferase activity from a Rous sarcoma virus enhancer reporter plasmid (RSV-Luc) was used as an independent standard for normalization, and efficiencies were corrected by using the *Renilla* luciferase assay system (Promega). All of the values are expressed as mean ± SEM of at least three independent experiments performed in duplicate.

Neurosphere cultures. Pieces from cerebral cortex dissected from E18 mouse fetuses were mechanically triturated in serum-free DMEM and then filtered through a 40 μm nylon cell strainer (BD Biosciences). After

centrifugation, the pellet was resuspended in a solution containing 0.25% trypsin with 0.1 mM EDTA (Invitrogen), 1 μg/ml hyaluronidase (Sigma), and 30 μg/ml DNase (Promega), and incubated with agitation at 37°C for 1 h. Cells were then centrifuged and resuspended in Dulbecco's PBS (Invitrogen) containing 0.9 M sucrose, centrifuged again, and washed in Dulbecco's PBS containing 4% BSA. Finally, cells were resuspended in DMEM-F12 mixture (1:1) medium (Invitrogen) containing B27 supplement (Invitrogen) and were seeded in six-well plates (BD Biosciences). Basic FGF and epidermal growth factor (EGF) (PeproTech) were added to a concentration of 10 ng/ml each, and the cultures were maintained in a 37°C incubator. From the second day on, bFGF and EGF were added daily at a concentration of 5 ng/ml each. After 7 d, neurospheres were transferred onto poly-ornithine-coated glass coverslips in 24-well dishes containing DMEM-F12 medium without bFGF or EGF to allow them to attach, and BDNF (PeproTech) was added to a concentration of 50 ng/ml to induce neurogenesis. After an additional period of 5 d in culture, neurospheres were fixed and processed for immunocytochemistry followed by confocal microscopy.

ChIP assays. For chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays (Gerish et al., 2001), cells were treated with 1% formaldehyde for 10 min, pelleted by centrifugation in PBS, and sonicated. Chromatin was diluted in buffer containing 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, and protease inhibitors. Immunoprecipitations were performed using an anti-DREAM rabbit polyclonal IgG (FL-214; Santa Cruz Biotechnology), or control normal rabbit IgG (s.c.-2025; Santa Cruz Biotechnology). Antibody-protein-DNA complexes were isolated by incubation with protein A-Sepharose. The DNA was eluted and detected by PCR using oligonucleotide primers that amplify a 270 nucleotide fragment of the proximal promoter region of the GFAP gene. The sequences of the oligonucleotide primers were as follows: forward, 5'-CCCTCTCCTGACCCATTTACCAGAA-3'; reverse, 5'-GCCCTGACCATCGTCTCGGAGGAG-3'. PCR conditions were as follows: 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s, after which a 5 min incubation at 72°C followed. As a negative control, PCR was performed using oligonucleotide primers that amplify a 430 nucleotide fragment of the promoter of the somatostatin gene. In this case, PCR conditions were 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s, followed by a 5 min incubation at 72°C. The sequences of the oligonucleotide primers were as follows: forward, 5'-GATTGGACAAAGTGATGCTC-3'; reverse, 5'-AGTGAGGGGAGGCGACAC-3'. PCR products were run on a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed.

Electrophoretic mobility shift assays. Nuclear protein extracts from primary cortical precursor cells were prepared and electrophoretic mobility shift assays were performed exactly as described (Cebolla and Vallejo, 2006). The sequences of the oligonucleotides used were as follows (sense strand): DRE1, 5'-GATCCAAGTATGCACTGTCAAACAGGCA-3'; mutated DRE1 (DRE1m), 5'-GATCCAAGTATGCACGCGTAAACAGGCA-3'; DRE2, 5'-GATCCGCCAGGAAGTCAGGGGCGAGA-3'; DRE2m, 5'-GATCCGCCAGGACTGCAGGGGCGAGA-3'.

For supershift experiments, nuclear extracts were preincubated with anti-DREAM antiserum Ab 1013 (Link et al., 2004) provided by Dr. J. R. Naranjo (Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, Spain), before the addition of the labeled probes.

Measurement of [Ca²⁺]_i variations. Ca²⁺ levels in primary cortical precursor cells were monitored by fluorescence microscopy. Cultures were incubated at 37°C for 20–45 min with the Ca²⁺ indicator Fluo-3-AM (10 μg/ml; Invitrogen). Cells were illuminated with a xenon lamp at 490 nm using a monochromator Polychrome II (T.I.L.L. Photonics) during 200–500 ms, and imaged using a CCD camera (Retiga EX; QImaging) attached to an upright BW50WI Olympus microscope. Images were acquired every 15–30 s. The control of the Polychrome II and the CCD camera, and the quantitative epifluorescence measurements, were made using the IPLab software (Scanalytics). [Ca²⁺]_i variations were estimated as $\Delta F/F_0$ after background subtraction, and cells were considered to respond to the stimulation when the fluorescence signal increased both five times above the SD of the basal signal and >5% for at least two consecutive images. Data are expressed as mean ± SEM.

Mice. DREAM-deficient mice (Cheng et al., 2002) were provided by

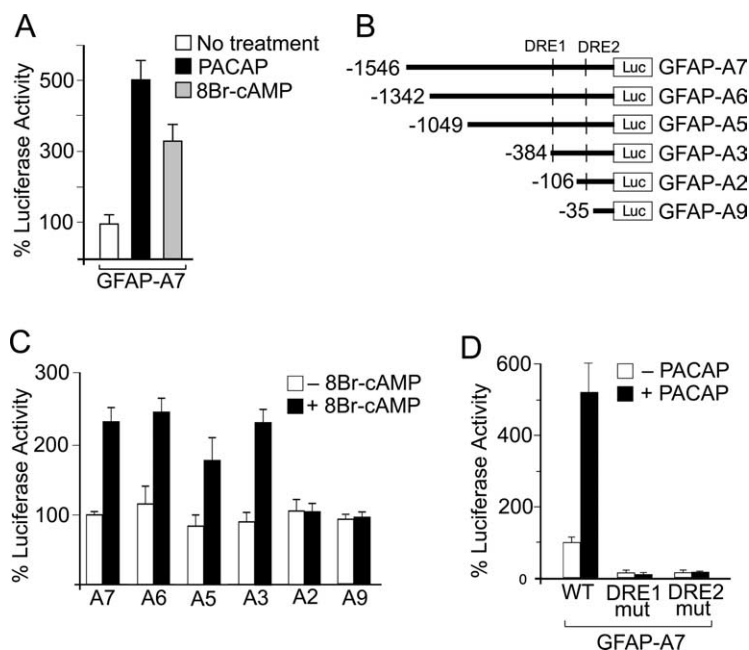


Figure 1. Stimulation of the GFAP promoter by PACAP depends on the integrity of DRE sites. **A**, Relative levels of luciferase activity elicited in primary cortical precursor cells transfected with the reporter plasmid GFAP-A7Luc. Cells were left untreated, or were treated with PACAP (100 nM) or 8Br-cAMP (1 mM). **B**, Schematic depiction of the 5'-deletion constructs of the rat GFAP-luciferase fusion gene used in transfection studies for deletional analysis of the promoter. The relative positions of DRE1 and DRE2 are indicated. **C**, Relative luciferase activities elicited in primary cortical precursor cells transfected with the luciferase reporter plasmids indicated above to map the location of promoter regions required for the response to cAMP. Note that deletion to nucleotide -106 (GFAP-A2) abolishes the response to 8Br-cAMP, even though DRE2 is present. **D**, Mutations of either DRE1 or DRE2 identical to those depicted in Figure 2C abolish basal and PACAP-stimulated luciferase activity in primary cortical precursor cells transfected with the luciferase reporter plasmid GFAP-A7. Values represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate.

Dr. J. M. Penninger (University of Toronto, Toronto, Canada) and were maintained in a C57BL/6 background. Null mutants were produced by mating heterozygote animals, and genotyping was performed by PCR using genomic DNA as described previously (Cheng et al., 2002).

Immunocytochemistry. DAB immunocytochemistry was performed exactly as described previously (Vallejo and Vallejo, 2002), using a GFAP-specific monoclonal antibody (1:500 dilution, clone G-A-5; Sigma) and immunoperoxidase staining with a Vectastain ABC kit (Vector Laboratories). For double antigen immunofluorescence, cells were grown on glass coverslips, and incubation with anti-GFAP monoclonal antibody and rabbit polyclonal anti-DREAM IgG was followed by incubation with 594-Alexa anti-rabbit and 488-Alexa anti-mouse secondary antibodies (1:1000; Invitrogen). Images were taken using confocal microscopy.

Neurospheres attached to coverslips were incubated with anti-neuronal-specific class III β -tubulin (Tuj1) monoclonal antibody (1:500; Sigma) followed by incubation with a 488-Alexa anti-mouse secondary antibody (1:1000; Invitrogen). Nuclei were counterstained with Hoechst (Invitrogen). Digital images were taken using confocal microscopy. Cell counts were performed on the crown of cells attached to the plate surrounding the neurosphere. The percentage of Tuj1-positive cells relative to the total number of cells was determined. The number of neurospheres analyzed was 17–20 in three different experiments. Data represent the mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test.

Immunohistochemistry. DAB immunohistochemistry (Schwartz et al., 2000) was performed on cryostat sections (14 μ m) of brains fixed in 4% paraformaldehyde and incubated at 4°C overnight with anti-GFAP (1:400; Sigma) or anti-neuronal-specific nuclear protein (NeuN; 1:100; Millipore) monoclonal antibodies. Immunodetection was performed with immunoperoxidase staining with a Vectastain ABC kit (Vector Laboratories). For NeuN, staining was performed in the presence of nickel ammonium to yield a dark blue color. Images were taken on a Nikon microscope equipped with an Olympus DP50 digital camera.

For immunofluorescence, sections were incubated with an anti-S100 β monoclonal antibody (1:400; Sigma), followed by incubation with 488-Alexa anti-mouse secondary antibodies (1:1000; Invitrogen). Nuclei were counterstained with TO-PRO-3 (Invitrogen). Images were taken using a Leica TCS SP5 confocal microscope.

Cell counts were performed on digital images taken from sections corresponding to identical rostrocaudal levels, using calibrated AnalySIS imaging software (Soft Imaging System). Defined areas from the dorsal and lateral regions of the cortex (see Fig. 6C) or the hippocampus were used on both sides. At least three animals per experiment were used, and a total of five sections per animal were analyzed. Quantitative results provided represent the mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Student's *t* test.

Western immunoblot. Mouse cerebral cortex or cultured cells were lysed and proteins (20 μ g) were resolved by SDS-PAGE and blotted onto a nitrocellulose membrane. GFAP immunoreactivity was detected with a specific monoclonal antibody (clone G-A-5, Sigma; 1:10,000 dilution) followed by incubation with a horse anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000 dilution) (Bio-Rad). Immunoreactive bands were visualized using an enhanced chemiluminescence detection system (GE Healthcare). Membranes were subsequently stripped with stripping buffer (70 mM Tris, pH 6.8, 10% SDS, and 0.7% β -mercaptoethanol) for 20 min at 60°C, washed, and reprocessed using a monoclonal anti- α -tubulin antibody (1:20,000; Sigma). Films were scanned and densitometry measurements of bands were performed using NIH ImageJ 1.37b software.

Results

DREAM binds to specific sites of the promoter of the GFAP gene

To search for the existence of regulatory elements in the GFAP promoter that could mediate transcriptional responses to stimulation by PACAP/cAMP, we performed transient transfections in primary cortical precursor cells obtained from E17 rat fetuses. These are proliferating nestin-positive cells that differentiate into astrocytes in response to treatment with PACAP (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material) or with the cAMP analog 8Br-cAMP, a system that we have characterized in detail in previous studies (McManus et al., 1999; Vallejo and Vallejo, 2002; Cebolla and Vallejo, 2006). We observed that the activity of the luciferase reporter plasmid GFAP-A7Luc, spanning 1.5 kb of the GFAP promoter (Bonni et al., 1997), is stimulated in transfected cells treated with either PACAP or 8Br-cAMP (Fig. 1A). Because PACAP induces astroglialogenesis via stimulation of a cAMP-dependent signaling pathway (Vallejo and Vallejo, 2002), we then used 8Br-cAMP to map the promoter region responsible for the observed transcriptional effect by deletional analysis. We found that 8Br-cAMP failed to stimulate luciferase activity when a plasmid with a deletion to nucleotide -106 (GFAP-A2Luc) or to nucleotide -35 (GFAP-A9Luc) was used, indicating the location of putative cAMP-responsive regulatory elements downstream from nucleotide -384 (Fig. 1C).

This region does not contain a typical cAMP-response element, but we noticed the presence of two sites with GTCA motifs similar to those found in the prodynorphin and *c-fos* genes that bind DREAM (Carrión et al., 1998, 1999). Because DREAM participates in the regulation of transcriptional mechanisms that depend on cAMP stimulation (Ledo et al., 2000a), we termed these sites DRE1 (nucleotides –373 to –367) and DRE2 (nucleotides –62 to –59) and we sought to determine whether they are important for transcriptional transactivation in response to PACAP. Mutations in any one of these sites completely inhibited basal and PACAP-stimulated luciferase activity (Fig. 1D), suggesting that both DRE1 and DRE2 are important sites for transactivation of the GFAP gene. Thus, we investigated whether DRE1 and DRE2 are recognized by DREAM in cortical progenitor cells.

DREAM is expressed in primary cortical precursor cells before astrocyte differentiation was induced, and also in GFAP-expressing cells differentiated by PACAP (Fig. 2A). To determine whether DREAM binds to the endogenous GFAP gene in the context of native chromatin *in vivo*, we performed ChIP assays. The anti-DREAM antiserum specifically immunoprecipitated a fragment of chromatin corresponding to the proximal region of the GFAP promoter both in undifferentiated primary cortical precursor cells (Fig. 2B, left) and in cells treated with PACAP (Fig. 2B, right). ChIP specificity was tested on the promoter of the somatostatin gene, which was not amplified in samples obtained after immunoprecipitation with the anti-DREAM antiserum (Fig. 2B). Thus, these experiments indicate that DREAM occupies the GFAP promoter before the differentiation response is triggered, and remains bound after GFAP expression has been initiated.

Direct binding of DREAM to DRE1 and/or DRE2 was tested by electrophoretic mobility shift assays (Fig. 2C–E). Sequence-specific DNA-protein complexes were observed with nuclear extracts from primary cortical cells from E17 rat fetuses and DRE1 or DRE2 oligonucleotides, and the presence of DREAM in these complexes was detected by adding a specific anti-DREAM antiserum. Consistent with the results from the ChIP experiments mentioned above, treatment of cells with PACAP did not result in loss of binding of DREAM to either DRE1 or DRE2 (Fig. 2D,E). Thus, DREAM expressed in cortical precursor cells can bind specifically to the DRE1 and DRE2 sites of the GFAP promoter.

Stimulation of the GFAP promoter by DREAM requires the integrity of Ca²⁺-binding domains

To investigate whether DREAM activates the GFAP gene in response to PACAP, we cotransfected primary cortical precursor cells with the GFAP-A7Luc reporter and with an expression vector encoding DREAM (100 ng to 3 μ g). We found that DREAM did not modify basal or PACAP-induced luciferase activity (data not shown), suggesting that DREAM is bound to the GFAP promoter in saturating amounts. Thus, we sought to confirm a possible involvement of DREAM in the regulation of GFAP gene expression by cotransfecting GFAP-A7Luc with expression plasmids encoding dominant negative mutants of DREAM generated by mutations in the functional calcium-binding EF-hand domains, or in the leucine-charged domains (LCD) required for direct interactions with α -cAMP-responsive element modulator (α CREM) in response to increased levels of cAMP (Fig. 3A) (Carrión et al., 1999; Ledo et al., 2000a,b; Scsúcová et al., 2005).

We found that DREAM-EFm/LCDm, which has both EF-hand and LCD motifs inactive, did not alter basal luciferase activity but completely inhibited the stimulation of reporter activity

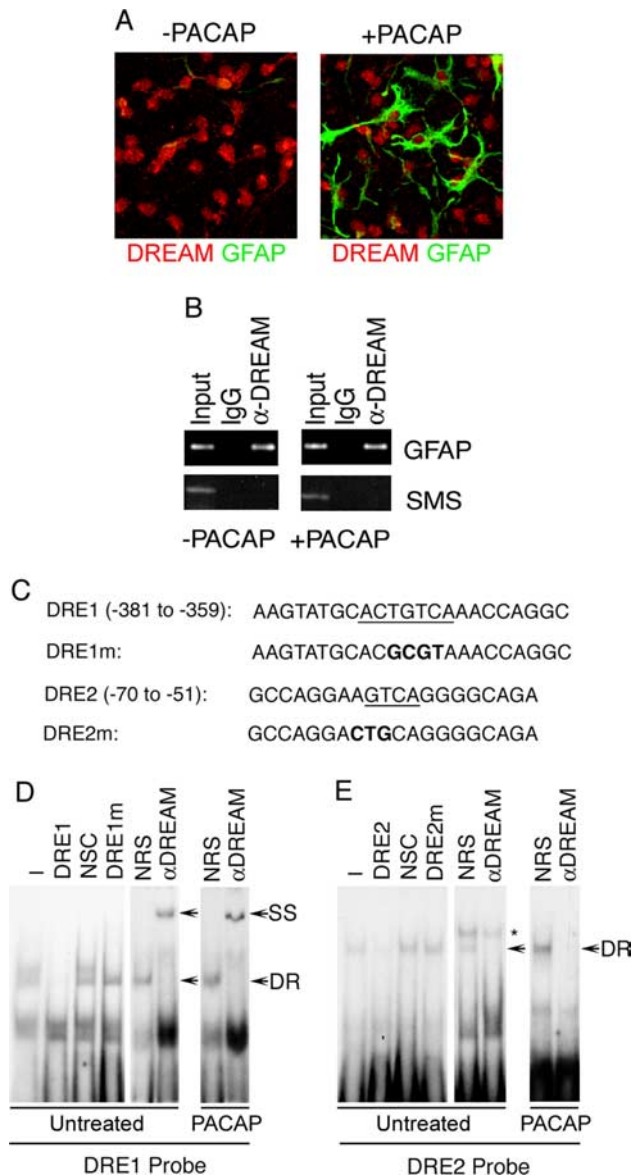


Figure 2. DREAM expressed in cortical neuroepithelial precursors induced to differentiate with PACAP occupies the promoter of the GFAP gene. **A**, DREAM immunofluorescence (red) in primary cortical neuroepithelial cells unexposed (left) or exposed (right) to PACAP (100 nM) for 2 d. All cells were processed for double-label DREAM (red) and GFAP (green) immunofluorescence. **B**, Chromatin immunoprecipitation assays indicating that DREAM occupies the promoter of the endogenous GFAP gene in primary cortical neuroepithelial cells. A specific anti-DREAM antiserum (α DREAM) or control normal rabbit IgG were used for immunoprecipitations. Undifferentiated primary cortical precursors (left) or GFAP-expressing cells differentiated with PACAP (100 nM) for 2 d (right) were used. PCR amplifications were not obtained with the control somatostatin (SMS) gene (bottom). **C**, Sequence of the wild-type or mutated DRE1 and DRE2 oligonucleotides used in the electrophoretic mobility shift assays. The consensus DREAM-binding sites are underlined, and the nucleotides mutated are indicated in bold. The nucleotide numbers relative to the transcription initiation site are indicated in parenthesis. **D**, Electrophoretic mobility shift assays showing the binding of proteins present in nuclear extracts of cortical precursor cells cultured from E17 rat brains to an oligonucleotide probe corresponding to a region of the rat GFAP promoter that contains the DRE1-binding site (nucleotides –381 to –359). Cells were left untreated or were treated with PACAP (100 nM) for 2 d before nuclear extracts were prepared. Nuclear extracts were incubated in the absence (–) or presence of a competing oligonucleotide of identical probe sequence (DRE1) or in the presence of a nonspecific competing (NSC) oligonucleotide of unrelated sequence, or a mutated DRE1 oligonucleotide (DRE1m), each used in a 100-fold molar excess. In addition, binding reactions were performed in the presence of either nonimmune rabbit serum (NRS) or anti-DREAM antiserum. Arrows indicate bands corresponding to protein-DNA complexes containing DREAM (DR) and to the supershifted (SS) complexes. **E**, Experiments similar to those described in **D**, but using a probe corresponding to the DRE2 element. In this case, addition of the anti-DREAM antiserum results in inhibition of binding. The asterisk indicates a nonspecific band.

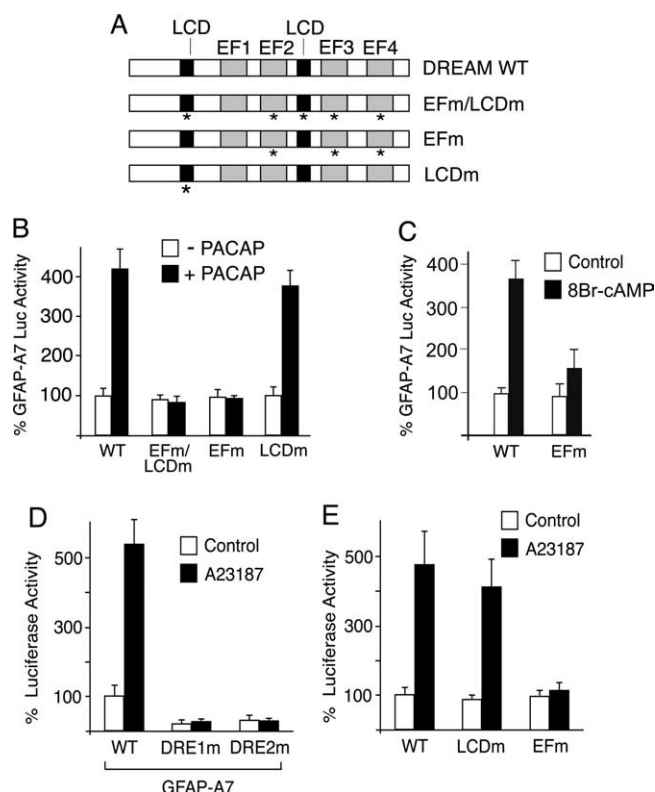


Figure 3. DREAM mediates calcium-dependent stimulation of the GFAP promoter by PACAP and cAMP. **A**, Schematic depiction of the wild-type and mutated versions of DREAM used in the transfection experiments. The mutated LCD or EF-hand motifs are indicated by asterisks. **B**, Relative luciferase activities elicited in primary cortical precursor cells cotransfected with the reporter plasmid GFAP-A7Luc, and expression vectors encoding wild-type or mutated versions of DREAM, as indicated schematically in **A**. Cells were left untreated, or treated with PACAP (100 nM). **C**, Relative luciferase activities elicited in primary cortical precursor cells cotransfected with GFAP-A7Luc, and expression vectors encoding wild-type DREAM or a version of DREAM in which the EF-hands have been mutated. In this case, cells were treated with 8Br-cAMP (1 mM). **D**, Mutations of either DRE1 or DRE2 abolish basal and calcium ionophore A23187-stimulated luciferase activity in primary cortical precursor cells transfected with the GFAP-A7Luc reporter. **E**, Relative luciferase activities elicited in primary cortical precursor cells cotransfected with GFAP-A7Luc, and expression vectors encoding wild-type DREAM or mutated versions of DREAM in which either the LCD domain or the EF-hand domains had been mutated. Cells were left untreated or treated with the calcium ionophore A23187 (0.02 μ M). In all cases, values are expressed as percentages of the activities elicited by GFAP-A7Luc, and represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicate.

elicited by PACAP (Fig. 3B), suggesting that DREAM mediates PACAP-induced GFAP promoter activation via mechanisms that involve cAMP- and/or calcium-dependent signaling. Because stimulation of GFAP expression by PACAP requires cAMP (Vallejo and Vallejo, 2002), we hypothesized that PACAP could act by promoting the interaction of phosphorylated α CREM with the LCD domains of DREAM, a mechanism by which DREAM mediates cAMP-dependent responses (Ledo et al., 2000a). However, DREAM-LCDm, which contains intact EF-hands and a double mutation (L47,52V) in the first LCD whose integrity is required for cAMP-dependent DREAM- α CREM interactions (Ledo et al., 2000a), did not alter significantly the stimulation of luciferase activity induced by PACAP (Fig. 3B), indicating that interactions with α CREM are not involved in this response. Furthermore, we did not observe alterations in the luciferase activity induced by PACAP when an expression vector encoding α CREM was cotransfected, or when cells were pretreated with the protein kinase A inhibitor H89 (data not shown). In contrast, mutations

of the three functional EF-hand motifs completely blocked the capacity of PACAP or 8Br-cAMP to stimulate GFAP-A7Luc activity (Fig. 3B,C). Thus, these results suggest that the transcriptional activation of the GFAP gene induced by PACAP and cAMP involves a Ca²⁺-dependent mechanism.

To investigate this, we first determined whether an increase in [Ca²⁺]_i is sufficient to stimulate transcription from the GFAP promoter. We found that in transfected cells, treatment with the calcium ionophore A23187 stimulated GFAP-A7Luc activity with a magnitude similar to that obtained with PACAP, but this activation was dependent on the integrity of DRE sites (Fig. 3D). To test whether DREAM mediates this response, we cotransfected GFAP-A7Luc with expression vectors encoding dominant negative inhibitors. We found that the LCD mutant version of DREAM did not alter the stimulation of luciferase activity induced by A23187. In contrast, an EF-hand DREAM mutant completely inhibited the stimulation induced by A23187 (Fig. 3E). Thus, these experiments demonstrate that DREAM mediates the calcium-dependent transcriptional transactivation of the GFAP promoter.

PACAP increases [Ca²⁺]_i in cortical precursor cells in a cAMP-dependent manner

Astrocyte differentiation of cortical precursors induced by PACAP is blocked by the cAMP antagonist Rp-adenosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate (Rp-cAMPS) (Vallejo and Vallejo, 2002). To determine whether treatment of cortical precursor cells with PACAP rises [Ca²⁺]_i in a cAMP-dependent manner, we monitored changes in the intensity of the fluorescence emitted by cortical precursor cells that had been loaded with the calcium indicator Fluo-3-AM in response to different types of treatments.

Incubation of cells with PACAP (1 μ M) resulted in a relatively slow but sustained increase in cell fluorescence values that became evident between 1 and 5 min after the administration of the peptide, and lasted for >15 min (~75% of cells were active 15 min after the onset of treatment) (Fig. 4). These changes were specifically caused by the effect of PACAP, because administration of equimolar amounts of the related vasoactive intestinal peptide (VIP) did not have any significant effect (Fig. 4B), consistent with our previous observation that PACAP acts on cortical precursor cells via activation of specific PAC1 receptors that are not recognized by VIP (Vallejo and Vallejo, 2002). Importantly, pretreatment of cells with the cAMP antagonist Rp-cAMPS completely blocked the effect of PACAP on [Ca²⁺]_i increase (Fig. 4A,B). These results indicate that the activation of specific receptors by PACAP induces elevations in [Ca²⁺]_i in cortical precursor cells via a cAMP-dependent pathway.

Furthermore, we found that exposure of cells to thapsigargin, a Ca²⁺-ATPase inhibitor that depletes internal Ca²⁺ stores, did not significantly modify the capacity of PACAP to increase [Ca²⁺]_i (Fig. 4C). In contrast, when cells were incubated in Ca²⁺-free medium PACAP failed to increase [Ca²⁺]_i (Fig. 4C). Thus, these experiments indicate that cAMP-dependent PACAP-induced increase in [Ca²⁺]_i is caused by calcium influx from the extracellular medium.

DREAM is necessary for PACAP-induced GFAP expression in cortical precursors and regulates astrocyte differentiation

All of the above experiments indicate that PACAP induces the expression of GFAP by increasing [Ca²⁺]_i in a cAMP-dependent manner, and that calcium acts on DREAM to transactivate the GFAP promoter. Therefore, we tested whether DREAM is implicated in astrocyte differentiation using knock-out mice in which

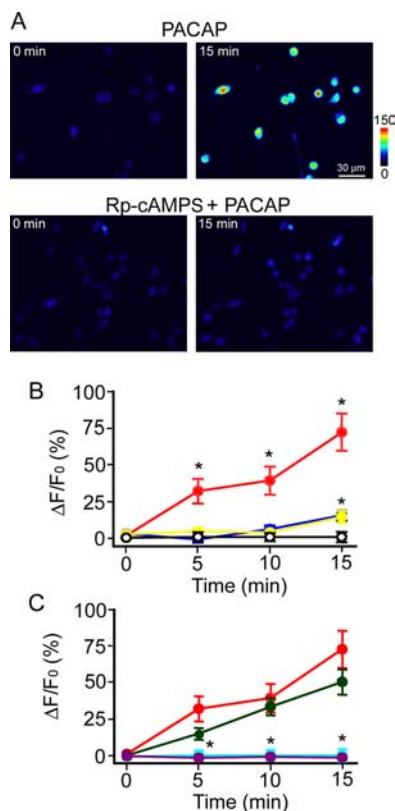


Figure 4. PACAP elicits cAMP-dependent increases in $[Ca^{2+}]_i$ in Fluo-3-AM-loaded primary cortical precursor cells. **A**, Pseudocolor images representing fluorescence intensities of Fluo-3-AM-loaded cells before (left, 0 min) and after (right, 15 min) exposure to PACAP ($1 \mu M$). Cells depicted in the bottom panels were treated with the cAMP antagonist Rp-cAMPS ($10 \mu M$) before exposure to PACAP. Scale bar, $30 \mu m$. **B**, Relative changes in fluorescence intensity observed in cortical precursor cells in the absence (blue circles) or presence of PACAP (red circles). Fluorescence intensity observed in cells pretreated with the cAMP antagonist Rp-cAMPS before exposure to PACAP is depicted by yellow circles. As an additional control for specificity, a group of cells was treated with the PACAP-related peptide VIP (white circles). In each condition, 75–120 cells from at least six coverslips were analyzed. **C**, Relative changes in fluorescence intensity observed in cells treated with PACAP in the absence (red circles) or presence (green circles) of thapsigargin ($1 \mu M$). An additional group of cells was incubated in medium lacking calcium (purple circles), and in that case PACAP did not elicit increases in $[Ca^{2+}]_i$ (light blue circles). In each condition, >45 cells from at least four coverslips were analyzed. Significant differences from control values were established at $*p < 0.001$.

the DREAM-encoding gene had been deleted by homologous recombination (Cheng et al., 2002). Initially, we tested for the induction of GFAP expression by immunocytochemistry in primary cultures of E16 mouse cortical precursor cells. As observed with rat cells cultured in similar conditions (McManus et al., 1999; Vallejo and Vallejo, 2002; Cebolla and Vallejo, 2006), exposure of cells prepared from wild-type mice to either PACAP or CNTF over a period of 2 d in culture resulted in the expression of GFAP accompanied by the extension of processes (Fig. 5A). In contrast, when cells prepared from *dream*^{−/−} mice were used, exposure to CNTF stimulated the expression of GFAP but exposure to PACAP did not (Fig. 5A). Western immunoblot confirmed lack of GFAP expression in DREAM-deficient PACAP-treated cells (Fig. 5B).

These experiments indicate that stimulation of GFAP expression by PACAP in cortical precursor cells requires the presence of DREAM. Because PACAP has been proposed to act as a neurotrophic signal during cortical development to regulate astrocytogenesis (Vallejo and Vallejo, 2002; Cebolla and Vallejo, 2006),

lack of DREAM could be predicted to impair cortical gliogenesis *in vivo*. To test this notion, we measured GFAP levels by Western immunoblot in the cerebral cortex of mice at postnatal day 1 (P1), a time that coincides with active astroglialogenesis. We found that *dream*^{−/−} mice contain GFAP levels that are reduced by $>50\%$ relative to those of control wild-type animals (Fig. 6). Reduced levels of GFAP were observed in DREAM-deficient mice for at least up to P3, although the magnitude of the difference at this time was smaller (Fig. 6A,B).

In addition, we demonstrated that the reduced levels of GFAP in the brains of DREAM-deficient mice are caused by a primary defect in astrocyte differentiation and not to a decrease in the expression of the GFAP gene at the transcriptional level, because the number of cortical astrocytes, as assessed by immunohistochemistry for the astroglial markers GFAP and S100 β , was determined to be smaller in *dream*-mutant mice than in control animals (Fig. 6D–G). The numbers of immunoreactive cells per square millimeter in wild-type and knock-out animals were 1262 ± 80 and 817 ± 104 , respectively, for GFAP, and 1021 ± 66 and 637 ± 109 , respectively, for S100 β (in both cases, $p < 0.002$, Student's *t* test). Furthermore, this is not a local effect restricted to the cortex, because we also observed reduced numbers of GFAP-stained cells in other areas of the brain including white matter tracts such as the corpus callosum (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). These data indicate that generation of astrocytes in DREAM deficient mice is defective, underscoring the importance of DREAM for astroglialogenesis during the development of the cerebral cortex.

Lack of DREAM delays the timing of the neurogenic to gliogenic switch

Because it is well established that the onset of astroglialogenesis takes place after neurogenesis is mostly completed, and that at least some gliogenic signals coordinately inhibit neurogenesis (Miller and Gauthier, 2007), we examined whether the apparent delay in the onset of gliogenesis was accompanied by an alteration in the number of neurons that could indicate a concomitant delay in the inhibition of neurogenesis. To this end, we performed NeuN immunohistochemistry and counted the number of immunopositive cells in the cortex of P1 mice. We found that in P1 *dream*-deficient mice, the number of NeuN-immunopositive neurons is increased by $\sim 20\%$ relative to wild-type controls (4072 ± 170 vs 3298 ± 172 neurons/mm²; $p < 0.005$, Student's *t* test) (Fig. 7A). When we performed a similar analysis in P7 mice, we found that the number of neurons was still higher in *dream*-deficient than in control animals (2066 ± 122 vs 1740 ± 69 neurons/mm²; $p < 0.03$, Student's *t* test), indicating that this effect persists and is sustained well beyond the time of completion of neurogenesis.

One possible explanation for this observation is that, apart from its involvement in the mechanisms that promote astroglialogenesis in response to specific signals, DREAM could participate coordinately in restrictive mechanisms opposing the generation of neurons at the end of the period of neurogenesis. Therefore, if DREAM regulates the generation of neurons negatively, a prediction would be that DREAM-deficient neural precursors would show an enhanced capacity to generate neurons. To test this prediction, we analyzed the number of neurons generated from cortical precursors in neurospheres allowed to differentiate in the presence of BDNF. We found that the percentage of Tuj1-immunoreactive cells was 15.3 ± 2.2 in BDNF-treated neurospheres from control animals and 26.2 ± 2.3 BDNF-treated neurospheres from DREAM-null mice ($p < 0.005$, Student's *t* test).

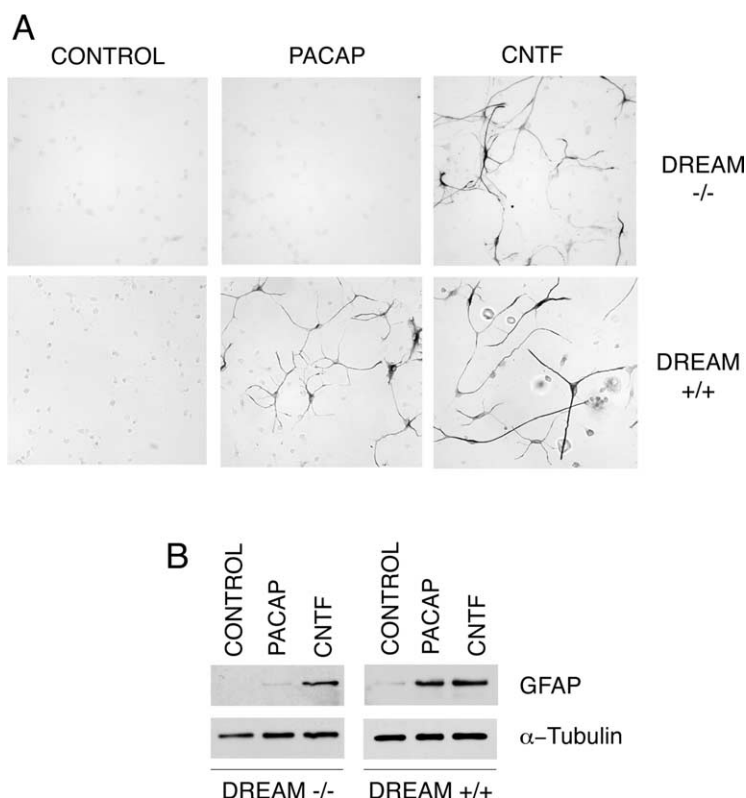


Figure 5. DREAM is required for expression of GFAP induced by PACAP in mouse fetal cortical precursor cells. **A**, Immunocytochemical staining of GFAP in primary cells prepared from the cerebral cortex of E16 mouse fetuses and cultured in defined medium in the presence of bFGF (control). To induce differentiation, bFGF was withdrawn and cells were treated for 2 d with PACAP (100 nM) or CNTF (50 ng/ml). No GFAP immunoreactivity was detected in untreated control cells, or in cells prepared from DREAM-deficient mice treated with PACAP. **B**, Western immunoblots showing GFAP expression in extracts of mouse primary cortical cells treated under the same conditions to those shown in **A**. Note that GFAP is not detectable in PACAP-treated cells prepared from DREAM-deficient mice. α -Tubulin immunoreactivity was used as a control to monitor the even loading of samples.

Thus, neurospheres prepared from DREAM-deficient mice generated a higher number of neurons than those prepared from wild-type animals (Fig. 7B), consistent with a restrictive role for DREAM on neurogenesis important for regulating the timing of the neurogenic-to-gliogenic switch.

In light of these results, and given that newly generated neurons appear to have a direct effect on the generation of astrocytes by activating neurotrophic cytokine signaling (Barnabé-Heider et al., 2005), which appears to be unaffected in DREAM-deficient mice (Fig. 5), we sought to determine the GFAP content and the number of astrocytes in older animals once astroglialogenesis has been completed.

We found that GFAP expression in the cerebral cortex of DREAM-deficient mice from P7 onwards is higher than in control animals (Fig. 8A,B). In adult animals (12 weeks), GFAP immunostaining revealed a higher number of astrocytes in the brains of mice lacking DREAM (86 ± 4.2 GFAP⁺ cells/mm²) than in those of age-matched wild-type controls (72 ± 2.3 GFAP⁺ cells/mm²; $p < 0.05$, Student's *t* test) (Fig. 8C). This increase in the number of astrocytes is probably not caused by increased astrocyte proliferation, because we did not observe increased number of proliferating GFAP-positive cells in DREAM-deficient mice treated with intraperitoneal injections of bromodeoxyuridine (50 mg/kg) (data not shown). Thus, together, our results indicate that during the early postnatal period lack of DREAM results in increased number of neurons and delayed astroglialogenesis, but that once astrocyte generation has started,

compensatory mechanisms appear to be activated to maintain the balance between the number of neurons and the number of astrocytes.

Discussion

We showed previously that PACAP triggers astrocytogenesis by stimulating cAMP synthesis after acting on specific PAC1 receptors present in cortical precursors (Vallejo and Vallejo, 2002). Here, we show that cAMP production induced by PACAP in cortical precursor cells results in a raise in $[Ca^{2+}]_i$, that Ca^{2+} acts on DREAM to stimulate transcription of the GFAP gene, and that DREAM is required for the regulation of normal astrocyte differentiation *in vivo*. As the expression of PACAP and PACAP receptors in the developing cortex is well documented (Skoglösa et al., 1999; Jaworski and Proctor, 2000; Suh et al., 2001), we propose that the PACAP-cAMP- Ca^{2+} -DREAM cascade constitutes a novel signaling pathway to generate astrocytes in the developing brain.

DREAM as a transcriptional transactivator of the GFAP gene

The observations that a dominant negative mutant of DREAM inhibits GFAP promoter stimulation by PACAP, and that DREAM bound to the GFAP promoter in cortical precursor cells remains in place after induction of astrocyte differentiation, indicate that DREAM acts as a transcriptional transactivator. This is an unexpected finding, because DREAM has been shown previously to act as a repressor, allowing transcriptional stimulation after dissociation from regulatory elements located downstream of the transcription initiation site of target genes (Carrión et al., 1999; Ledo et al., 2000a; Campos et al., 2003). However, transcriptional transactivation by DREAM is not unprecedented, because DREAM has been described to act as an activator by binding to sites located upstream of a TATA box (Scsucova et al., 2005).

The mechanism by which DREAM transactivates the GFAP promoter in response to calcium is likely to involve changes in protein conformation (Carrión et al., 1999; Osawa et al., 2001, 2005) that could be stabilized by interactions with other proteins bound in close proximity (Rivas et al., 2004; Gomez-Villafuertes et al., 2005; Scsucova et al., 2005). Of note, the transcription factor nuclear factor-1 is important for GFAP expression and occupies a site in the GFAP promoter located adjacent to DRE2 (Cebolla and Vallejo, 2006). The observation that disruption of DREAM binding to DNA by mutation of the DRE sites completely abolishes GFAP promoter activity further indicates that DREAM may be a key component to assemble transcriptionally competent protein complexes.

DREAM stimulates GFAP gene transcription in response to PACAP via a Ca^{2+} -dependent mechanism, as indicated by the observation that integrity of the EF-hands is required for GFAP promoter activation. Furthermore, the antagonist Rp-cAMPS inhibits PACAP-induced Ca^{2+} entry (this study) and astrocyte dif-

ferentiation (Vallejo and Vallejo, 2002). These findings, together with our observations that cortical precursor cells from *dream*^{-/-} mice fail to activate GFAP expression after exposure to PACAP, and that lack of DREAM results in delayed generation of cortical astrocytes *in vivo*, support that cAMP-dependent elevation of [Ca²⁺]_i induced by PACAP constitutes an important signal to stimulate astrocytogenesis.

It is well established that PACAP increases [Ca²⁺]_i by mobilizing intracellular pools or by increasing extracellular calcium influx (Chatterjee et al., 1996; Przywara et al., 1996; Osipenko et al., 2000; Morita et al., 2002; Liu et al., 2003; Payet et al., 2003). Our data favor the notion that in cortical precursors PACAP promotes calcium entry from the extracellular milieu, in agreement with previous reports indicating that PACAP-induced Ca²⁺ influx requires the activation of cAMP-dependent signaling (Przywara et al., 1996; Osipenko et al., 2000). Also, this is consistent with our observation that the most abundant PACAP receptor isoform expressed in cortical precursor cells is the short splice variant of the PAC1 receptor (Vallejo and Vallejo, 2002), which couples to stimulation of adenylate cyclase.

Fluctuations in [Ca²⁺]_i in cortical progenitor cells have been shown to occur as coordinated waves that depend on intracellular stores and modulate cell proliferation or neuronal differentiation (Owens and Kriegstein, 1998; Weissman et al., 2004), or as a consequence of increased influx from the extracellular milieu via activation of membrane channels (D'Ascenzo et al., 2006; Ma et al., 2001; Sah et al., 1997). Thus, calcium can be mobilized dynamically in different ways within neuroepithelial cells to participate in different signaling processes that coordinately regulate proliferation or differentiation into neurons or astrocytes.

Our results show that astrocytes can be generated by CNTF in DREAM-lacking cortical precursor cells, although these do not respond to PACAP. CNTF (and other neurotrophic cytokines) generates astrocytes by activating a gp130-JAK-STAT pathway (Bonni et al., 1997; Rajan and McKay, 1998; Nakashima et al., 1999). Thus, although PACAP and CNTF can synergistically activate GFAP expression (Cebolla and Vallejo, 2006), our results indicate that the CNTF-gp130-JAK-STAT pathway can function independently from the PACAP-cAMP-Ca²⁺-DREAM pathway.

Role of DREAM in astrocyte differentiation

The requirement of DREAM for appropriate expression of GFAP during astrocytogenesis is indicated by our observations that cortical precursor cells prepared from *dream*^{-/-} mice fail to differentiate into astrocytes in response to PACAP, and that these mice exhibit lower levels of GFAP and reduced astrocytogenesis during the early postnatal period. These observations are also consistent with the finding that treatment of rats with a PACAP receptor antagonist during late pregnancy significantly reduces the number of cortical astrocytes in the offspring (Zupan et al., 1998).

We found that lack of DREAM does not prevent, but delays,

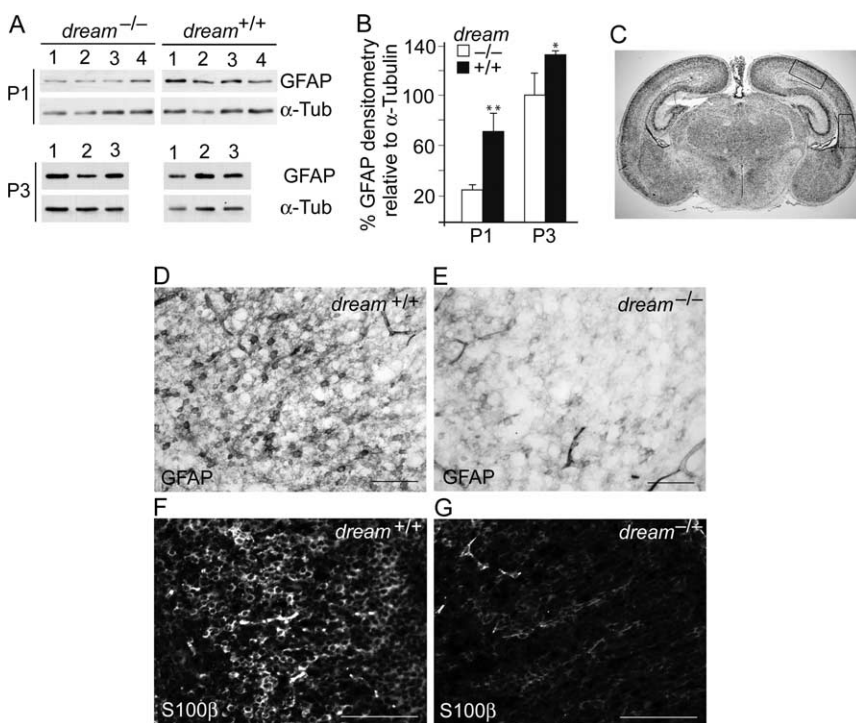


Figure 6. DREAM-deficient mice exhibit reduced number of astrocytes in the cortex during early postnatal period. **A**, Western immunoblots showing GFAP expression in extracts of cortices isolated from P1 or P3 DREAM-deficient (*dream*^{-/-}) or control wild-type (*dream*^{+/+}) mice. The numbers on top of each panel indicate individual mice from which samples were obtained. α-Tubulin (α-Tub) immunoreactivity was used as a control to monitor even loading of samples. **B**, Densitometric analysis performed to quantify the relative intensity of DREAM-immunoreactive bands detected by Western immunoblot. Results are expressed as percentage of increment of densitometry measurements of DREAM bands (in arbitrary units) relative to the intensity of the corresponding α-tubulin bands. **p* < 0.05; ***p* < 0.02. This figure represents one of four different experiments with similar results. **C**, Cresyl violet-stained brain section showing a schematic depiction of the dorsal and lateral regions (boxed areas) of the cortex of P1 mice used to determine the number of astrocytes after immunohistochemical staining. Cells from symmetrical regions on both sides were counted. **D–G**, Representative examples of sections from the dorsal cortex of P1 wild-type (**D**, **F**) or *dream*-deficient (**E**, **G**) mice, processed for GFAP immunoperoxidase staining (**D**, **E**) or S100β immunofluorescence (**F**, **G**) used for quantitative analysis. Scale bars, 50 μm.

GFAP expression and astrocyte formation *in vivo*, despite the observation that cells lacking DREAM fail to respond to PACAP *in vitro*. The observed decrease in the number of astrocytes was accompanied by increased number of neurons at a time that coincides approximately with the onset of astrocyte generation after transition from neurogenesis to astrogenesis. This observation is consistent with the possibility that neurogenesis has not been inhibited in time and precursor cells keep on producing neurons instead of astrocytes. One possible interpretation of our results is that in cortical precursors DREAM might be part of a signaling mechanism involved in the coordinated inhibition of neurogenesis at the same time that it stimulates astroglialogenesis.

Signals acting on cortical precursors that stimulate astroglialogenesis and at the same time inhibit neurogenesis are important for regulating the timing of activation of the neurogenesis-to-astroglialogenesis switch (Miller and Gauthier, 2007). It is possible to predict that if these signals fail, the outcome would be an excess production of neurons at the expense of astrocytes, which would be present in lower numbers at the beginning of the astroglialogenic period. Our observations fit with this model, and thus support the notion that DREAM may be part of the complex mechanisms that operate during the transition from neurogenesis to astroglialogenesis.

Interestingly, the relatively high number of astrocytes generated in *dream* mutant mice after P7 indicates that mechanisms to

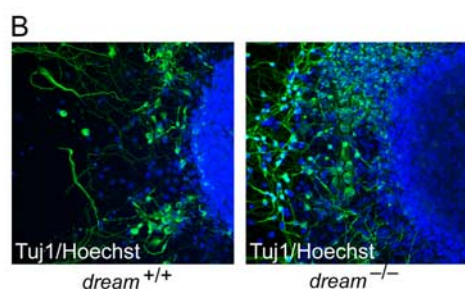
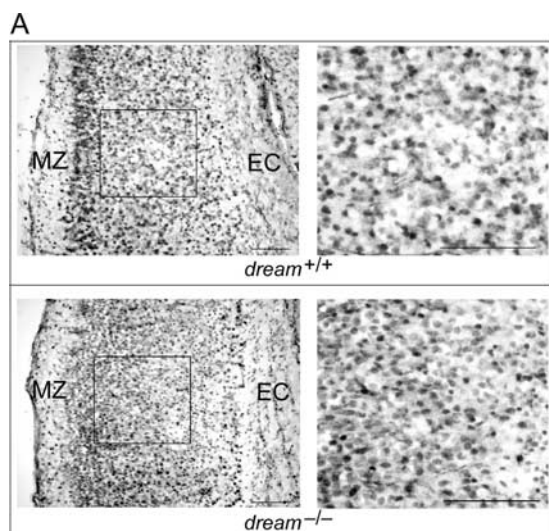


Figure 7. DREAM-deficient mice exhibit increased number of neurons in the cortex during early postnatal period. **A**, Photomicrograph depicting a lateral region of a coronal section of the brain from postnatal day 1 mice similar to that shown in Figure 6C. Sections from wild-type (top) or dream-deficient (bottom) mice were stained for NeuN immunoreactivity. The right panels depict higher-magnification images corresponding to the areas indicated by a rectangle. EC, External capsule; MZ, marginal zone. Scale bars, 100 μ m. **B**, Tuj1 immunoreactivity (green) detected in BDNF-treated attached neurosphere cultures prepared from the brains of wild-type (left) or dream-deficient (right) mice. Blue indicates cells counterstained with Hoechst.

compensate for the initial loss of astrocytes are activated to match the number of glial cells to that of neurons. The existence of this type of compensatory mechanisms has been proposed previously (Koblar et al., 1998; Barnabé-Heider et al., 2005; Miller and Gauthier, 2007) and could involve, at least in part, the activity of neuron-derived neurotrophic cytokines (Barnabé-Heider et al., 2005), which, in our case, would be present in higher amounts as a consequence of the initial overproduction of neurons. Therefore, in an environment relatively enriched in neurons, such as the one found in the developing cortex of newborn DREAM-deficient mice, this situation could yield to the delayed generation of a relatively increased number of astrocytes.

Obviously such a situation requires that the signaling pathways used by neurotrophic cytokines in neural precursors have to be intact. Neurotrophic cytokines secreted from newly differentiated neurons, which provide a major signal promoting the generation of astrocytes (Barnabé-Heider et al., 2005), act via the gp130-JAK-STAT pathway (Bonni et al., 1997; Koblar et al., 1998; Rajan and McKay, 1998; Nakashima et al., 1999; Barnabé-Heider et al., 2005). Our experiments with CNTF on cortical precursors indicate that this signaling pathway is not affected by lack of DREAM for the expression of GFAP. Whether the enhanced astrocyte generation observed in mice with defective DREAM-dependent signaling after overproduction of neurons and delayed astroglialgenesis is indeed attributable to the existence of

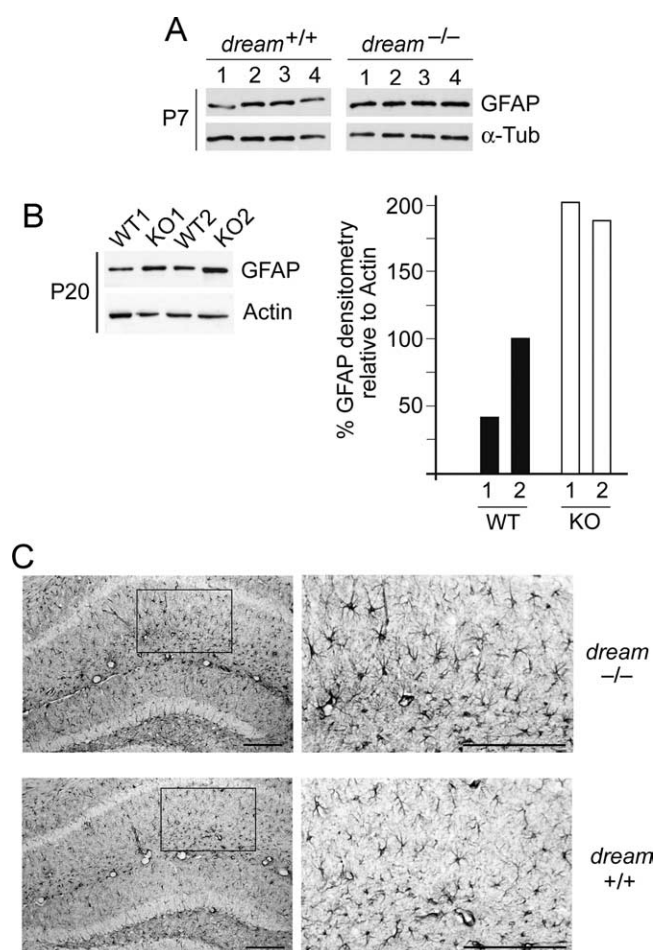


Figure 8. Increased number of astrocytes in the cortex of adult DREAM-deficient mice. **A**, Western immunoblots showing GFAP expression in extracts of cortices isolated from P7 DREAM-deficient (*dream*^{−/−}) or control wild-type (*dream*^{+/+}) mice. Numbers on top of each lane indicate individual mice from which samples were obtained. α -Tubulin (α -Tub) immunoreactivity was used as a control to monitor even loading of samples. Results from densitometric analyses performed to quantify the relative intensity of DREAM-immunoreactive bands expressed as a percentage of the increment of densitometry measurements (in arbitrary units) relative to the intensity of the corresponding α -tubulin bands were 84 ± 15 for wild-type mice and 137 ± 13 for DREAM-null mice (mean \pm SEM; $p < 0.002$, Student's *t* test). **B**, Western immunoblots showing GFAP expression in extracts of cortices isolated from P20 DREAM-deficient (KO) or control wild-type (WT) mice. The numbers on top of each lane indicate individual mice from which samples were obtained. Actin immunoreactivity was used as a control to monitor the even loading of samples. Depicted to the right is the densitometric analyses performed to quantify the relative intensity of DREAM-immunoreactive bands. Results are expressed as a percentage of the increment of densitometry measurements of DREAM bands (in arbitrary units) relative to the intensity of the corresponding actin bands. Individual densitometric values are plotted. **C**, Representative examples of sections from the hippocampus of dream-deficient (top) or wild-type (bottom) mice, processed for GFAP immunostaining used for quantitative analysis. The right panels depict higher-magnification images corresponding to the areas indicated by a rectangle. Scale bar, 100 μ m.

higher amounts of neuron-derived neurotrophic cytokines remains the subject of further investigations.

DREAM has been shown to regulate the expression of different neuronal genes acting as a transcriptional repressor (Carrión et al., 1999; Link et al., 2004; Gomez-Villafuertes et al., 2005). In this study, we present evidence indicating that in cortical precursor cells DREAM can act as a transcriptional transactivator that regulates GFAP gene expression during astrocyte differentiation via cAMP-dependent calcium signaling. Thus, these findings provide new insights into the mechanisms that regulate astrocytogenesis in the developing cortex.

References

- Angelastro JM, Mason JL, Ignatova TN, Kukekov VG, Stengren GB, Goldman JE, Greene LA (2005) Downregulation of activating transcription factor 5 is required for differentiation of neural progenitor cells into astrocytes. *J Neurosci* 25:3889–3899.
- Barnabé-Heider F, Wasylnka JA, Fernandes KJ, Porsche C, Sendtner M, Kaplan DR, Miller FD (2005) Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1. *Neuron* 48:253–265.
- Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, Stahl N, Yancopoulos GD, Greenberg ME (1997) Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278:477–483.
- Campos D, Jiménez-Díaz L, Carrión AM (2003) Ca²⁺-dependent prodynorphin transcriptional derepression in neuroblastoma cells in exerted through DREAM protein activity in a kinase-independent manner. *Mol Cell Neurosci* 22:135–145.
- Carrión AM, Mellström B, Naranjo JR (1998) Protein kinase A-dependent depression of the human prodynorphin gene via differential binding to an intragenic silencer element. *Mol Cell Biol* 12:6921–6929.
- Carrión AM, Link WA, Ledo F, Mellström B, Naranjo JR (1999) DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* 398:80–84.
- Cebolla B, Vallejo M (2006) Nuclear factor-1 regulates glial fibrillary acidic protein gene expression in astrocytes differentiated from cortical precursor cells. *J Neurochem* 97:1057–1070.
- Chatterjee TK, Sharma RV, Fisher RA (1996) Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels. *J Biol Chem* 271:32226–32232.
- Cheng HY, Pitcher GM, Laviolette SR, Whishaw IQ, Tong KI, Kockeritz LK, Wada T, Joza NA, Crackower M, Goncalves J, Sarosi I, Woodgett JR, Oliveira-dos-Santos AJ, Ikura M, van der Kooy D, Salter MW, Penninger JM (2002) DREAM is a critical regulator for pain modulation. *Cell* 108:31–43.
- D'Ascenzo M, Piacentini R, Casalbore P, Budoni M, Pallini R, Azzena GB, Grassi C (2006) Role of L-type Ca²⁺ channels in neural stem/progenitor cell differentiation. *Eur J Neurosci* 23:935–944.
- Fan G, Martinowich K, Chin MH, He F, Fouse SD, Hutnick L, Hattori D, Ge W, Shen Y, Wu H, ten Hoeve J, Shuai K, Sun YE (2005) DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development* 132:3345–3356.
- Gerrish K, Cissell MA, Stein R (2001) The role of hepatic nuclear factor 1α and PDX-1 in transcriptional regulation of the pdx-1 gene. *J Biol Chem* 276:47775–47784.
- Gomez-Villafuertes R, Torres B, Barrio J, Savignac M, Gabellini N, Rizzato F, Pintado B, Gutierrez-Adan A, Mellström B, Carafoli E, Naranjo JR (2005) Downstream regulatory element antagonist modulator regulates Ca²⁺ homeostasis and viability in cerebellar neurons. *J Neurosci* 25:10822–10830.
- Gross RE, Mehler MF, Mabie PC, Zang Z, Santschi L, Kessler JA (1996) Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 17:595–606.
- He F, Ge W, Martinowich K, Becker-Catania S, Coskun V, Zhu W, Wu H, Castro D, Guillemot F, Fan G, de Vellis J, Sun YE (2005) A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nat Neurosci* 8:616–625.
- Hermanson O, Jepsen K, Rosenfeld MG (2002) N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature* 419:934–939.
- Jaworski DM, Proctor MD (2000) Developmental regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and PAC1 receptor mRNA expression in the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 120:27–39.
- Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RDG (1996) Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 10:3129–3140.
- Koblar SA, Turnley AM, Classon BJ, Reid KL, Ware CB, Cheema SS, Murphy M, Bartlett PF (1998) Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3178–3181.
- Krohn K, Rozovsky I, Wals P, Teter B, Anderson CP, Finch CE (1999) Glial fibrillary acidic protein transcription responses to transforming growth factor-β1 and interleukin-1β are mediated by a nuclear factor-1-like site in the near-upstream promoter. *J Neurochem* 72:1353–1361.
- Ledo F, Carrión AM, Link WA, Mellström B, Naranjo JR (2000a) DREAM-αCREM interaction via leucine-charged domains derepresses downstream regulatory element-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 20:9120–9126.
- Ledo F, Link WA, Carrión AM, Echeverría V, Mellström B, Naranjo JR (2000b) The DREAM-DRE interaction: key nucleotides and dominant negative mutants. *Biochim. Biophys Acta* 1498:162–168.
- Link WA, Ledo F, Torres B, Palczewska M, Madsen TM, Savignac M, Albar JP, Mellström B, Naranjo JR (2004) Day-night changes in downstream regulatory element antagonist modulator/potassium channel interacting protein activity contribute to circadian gene expression in pineal gland. *J Neurosci* 24:5346–5355.
- Liu Z, Geng L, Li R, He X, Zheng JQ, Xie Z (2003) Frequency modulation of synchronized Ca²⁺ spikes in cultured hippocampal networks through G-protein-coupled receptors. *J Neurosci* 23:4156–4163.
- Ma W, Pancrazio JJ, Andreadis JD, Shaffer KM, Stenger DA, Li BS, Zhang L, Barker JL, Maric D (2001) Ethanol blocks cytosolic Ca²⁺ responses triggered by activation of GABA_A receptor/Cl[−] channels in cultured proliferating rat neuroepithelial cells. *Neuroscience* 104:913–922.
- Mabie PC, Mehler MF, Kessler JA (1999) Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype. *J Neurosci* 19:7077–7088.
- McManus MF, Chen LC, Vallejo I, Vallejo M (1999) Astroglial differentiation of cortical precursor cells triggered by activation of the cAMP-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 19:9004–9015.
- Mehler MF, Mabie PC, Zhang D, Kessler JA (1997) Bone morphogenetic proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 20:309–317.
- Miller FD, Gauthier AS (2007) Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 54:357–369.
- Morita K, Sakakibara A, Kitayama S, Kumagai K, Tanne K, Dohi T (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces a sustained increase in intracellular free Ca²⁺ concentration and catecholamine release by activating Ca²⁺ influx via receptor-stimulated Ca²⁺ entry, independent of store-operated Ca²⁺ channels, and voltage-dependent Ca²⁺ channels in bovine adrenal medullary chromaffin cells. *J Pharmacol Exp Ther* 302:972–982.
- Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, Kimura N, Hisatsune T, Kawabata M, Miyazono K, Taga T (1999) Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284:479–482.
- Namihira M, Nakashima K, Taga T (2004) Developmental stage dependent regulation of DNA methylation and chromatin modification in an immature astrocyte specific gene promoter. *FEBS Lett* 572:184–188.
- Nieto M, Schuurmans C, Britz O, Guillemot F (2001) Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29:401–413.
- Osawa M, Tong KI, Lilliehook C, Wasco W, Buxbaum JD, Cheng HY, Penninger JM, Ikura M, Ames JB (2001) Calcium-regulated DNA binding and oligomerization of the neuronal calcium-sensing protein, calsinin/DREAM/KChIP3. *J Biol Chem* 276:41005–41013.
- Osawa M, Dace A, Tong KI, Valiveti A, Ikura M, Ames JB (2005) Mg²⁺ and Ca²⁺ differentially regulate DNA binding and dimerization of DREAM. *J Biol Chem* 280:18008–18014.
- Osipenko ON, Barrie AP, Allen JM, Gurney AM (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide activates multiple intracellular signaling pathways to regulate ion channels in PC12 cells. *J Biol Chem* 275:16626–16631.
- Owens DF, Kriegstein AR (1998) Patterns of intracellular calcium fluctuation in precursor cells of the neocortical ventricular zone. *J Neurosci* 18:5374–5388.
- Park JK, Williams BP, Alberta JA, Stiles CD (1999) Bipotent cortical progenitor cells process conflicting cues for neurons and glia in a hierarchical manner. *J Neurosci* 19:10383–10389.
- Payet MD, Bilodeau L, Breault L, Fournier A, Yon L, Vaudry H, Gallo-Payet N (2003) PAC₁ receptor activation by PACAP-38 mediates Ca²⁺ release from a cAMP-dependent pool in human fetal adrenal gland chromaffin cells. *J Biol Chem* 278:1663–1670.
- Przywara DA, Guo X, Angelilli ML, Wakade TD, Wakade AR (1996) A non-cholinergic transmitter, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, utilizes a novel mechanism to evoke catecholamine secretion in rat adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* 271:10545–10550.
- Qian X, Davis AA, Goderie SK, Temple S (1997) FGF2 concentration regu-

- lates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* 18:81–93.
- Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, Temple S (2000) Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28:69–80.
- Rajan P, McKay RDG (1998) Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* 18:3620–3629.
- Rivas M, Mellström B, Naranjo JR, Santisteban P (2004) Transcriptional repressor DREAM interacts with thyroid transcription factor-1 and regulates thyroglobulin gene expression. *J Biol Chem* 279:33114–33122.
- Sah DW, Ray J, Gage FH (1997) Regulation of voltage- and ligand-gated currents in rat hippocampal progenitor cells *in vitro*. *J Neurobiol* 32:95–110.
- Sauvageot CM, Stiles CD (2002) Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 12:244–249.
- Schwartz PT, Perez-Villamil B, Rivera A, Moratalla R, Vallejo M (2000) Pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 expressed in developing brain regulates somatostatin gene transcription in embryonic neural cells. *J Biol Chem* 275:19106–19114.
- Scsucova S, Palacios D, Savignac M, Mellström B, Naranjo JR, Aranda A (2005) The repressor DREAM acts as a transcriptional activator on vitamin D and retinoic acid response elements. *Nucl Acids Res* 33:2269–2279.
- Skoglösa Y, Nobuyuki T, Lindholm D (1999) Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA in the developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 65:1–13.
- Song MR, Ghosh A (2004) FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat Neurosci* 7:229–235.
- Suh J, Lu N, Nicot A, Tatsuno I, DiCicco-Bloom E (2001) PACAP is an anti-mitogenic signal in developing cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4:123–124.
- Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, Lin MZ, Zubiaga A, Hua X, Fan G, Greenberg ME (2001) Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104:365–376.
- Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, Fujita N, Nakao M, Taga T (2001) DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* 1:749–758.
- Vallejo I, Vallejo M (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces astrocyte differentiation of precursor cells from developing cerebral cortex. *Mol Cell Neurosci* 21:671–683.
- Viti J, Feathers A, Phillips J, Lillien L (2003) Epidermal growth factor receptors control competence to interpret leukemia inhibitory factor as an astrocyte inducer in developing cortex. *J Neurosci* 23:3385–3393.
- Weissman TA, Riquelme PA, Ivic L, Flint AC, Kriegstein AR (2004) Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron* 43:647–661.
- Zupan V, Hill JM, Brenneman DE, Gozes I, Fridkin M, Robberecht P, Evrard P, Gressens P (1998) Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide II vasoactive intestinal peptide 2 receptor in mouse neocortical astrocytogenesis. *J Neurochem* 70:2165–2173.

Anexo II:
Publicaciones relacionadas
con la Tesis



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Neuroscience

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymcne

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates glial fibrillary acidic protein gene expression in cortical precursor cells by activating Ras and Rap1

Isabel Lastres-Becker^{1,2}, Antonio Fernández-Pérez¹, Beatriz Cebolla³, Mario Vallejo^{*}

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad Autónoma de Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 July 2007

Revised 23 April 2008

Accepted 8 July 2008

Available online xxxx

ABSTRACT

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) acts on cortical precursor cells to trigger glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene expression and astrocyte differentiation by stimulation of intracellular cAMP production. Here, we show that as expected, PACAP activates cAMP-dependent protein kinase A. However, inhibition of protein kinase A does not prevent PACAP-induced GFAP gene expression or astrogliogenesis. PACAP also activates the small GTPases Rap1 and Ras, but either activation of Rap1 alone by selective stimulation of the guanine nucleotide exchange factor Epac, or expression of a constitutively active form of Ras, do not induce GFAP gene expression. Ras is activated by PACAP in a cAMP-dependent manner, and inhibition of Ras and/or Rap1 decreases PACAP-induced GFAP promoter stimulation. Thus, cAMP-dependent PACAP-induced GFAP expression during astrogliogenesis involves the coordinated activation of both Ras and Rap1, but activation of either one of them in isolation is not sufficient to trigger this response.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

During development of the central nervous system, the sequential generation of the different cell types destined to populate the adult brain depends, in part, on the type of extracellular signals to which neural precursors are exposed (Savagot and Stiles, 2002). Cortical astrocytes differentiate from progenitor cells exposed to cytokines of the interleukin-6 family, such as ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF) or cardiotrophin-1, or to bone morphogenetic proteins (BMP) (Barnabé-Heider et al., 2005; Bonni et al., 1997; Gross et al., 1996; Ochiai et al., 2001; Rajan and McKay, 1998). The physiologic relevance of these findings is supported by studies showing that genetically engineered mice lacking one of the neurotrophic cytokines or their receptors exhibit a reduced number of astrocytes (Barnabé-Heider et al., 2005; Bugge et al., 1998; Koblar et al., 1998; Nakashima et al., 1999a), whereas the opposite is observed in the brains of mice overexpressing BMP (Gomes et al., 2003). Intracellular signaling systems triggered by neurotrophic cytokines and BMP, leading to the stimulation of GFAP gene transcription in differentiating astrocytes, involve the activation of

STAT and Smad proteins, respectively (Bonni et al., 1997; He et al., 2005; Nakashima et al., 1999b; Rajan and McKay, 1998).

Previous studies carried out in our laboratory indicate that pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a member of the vasoactive intestinal peptide (VIP)/secretin/glucagon family, provides an additional signal for the generation of astrocytes from neural precursor cells (Cebolla and Vallejo, 2006; Vallejo and Vallejo, 2002). PACAP promotes astrocyte differentiation by acting on specific PAC1 receptors present in cortical precursor cells. These receptors use the cAMP-dependent pathway as a major intracellular signaling mechanism of peptide activation (Spengler et al., 1993), and therefore exposure of cortical precursor cells to PACAP results in increased intracellular levels of cAMP (Vallejo and Vallejo, 2002). In addition, we found that the cAMP analog 8Br-cAMP is able to trigger astrocyte differentiation from cortical precursors (McManus et al., 1999), and that the astrogliogenic effect of PACAP can be blocked by a specific cAMP antagonist (Vallejo and Vallejo, 2002), thus supporting the notion that PACAP induces cortical precursor cell differentiation into astrocytes by activating a cAMP-dependent signaling pathway. However, the mechanisms by which cAMP triggers this response remain unknown.

It is known that cAMP can activate at least three different signaling pathways within cells. The first one to be characterized and the most extensively studied relies on the activation of protein kinase A (PKA), which then phosphorylates different substrates, including transcription factors such as CREB. Independently, cAMP can stimulate the guanine nucleotide exchange protein Epac (also known as cAMP-GEF), which then activates the GTPase Rap-1 (Bos, 2003). Finally, a third pathway has been identified in which the cAMP

* Corresponding author. Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Calle Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. Fax: +91 585 4401.

E-mail address: mvallejo@iib.uam.es (M. Vallejo).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Present address: Molecular Neurogenetics Section, Department of Neurology, JW Goethe University Medical School, Frankfurt am Main, Germany.

³ Present address: Health Consumer Powerhouse, Rue Fossé au Loups 34, Brussels, Belgium.

effector is another guanine nucleotide exchange protein called CNrasGEF, which activates Ras directly (Pham et al., 2000). In the present study, we have sought to determine the relative contribu-

tions of each one of these pathways to the stimulation of GFAP gene transcription during the astrocytogenic effect of PACAP in cortical precursor cells.

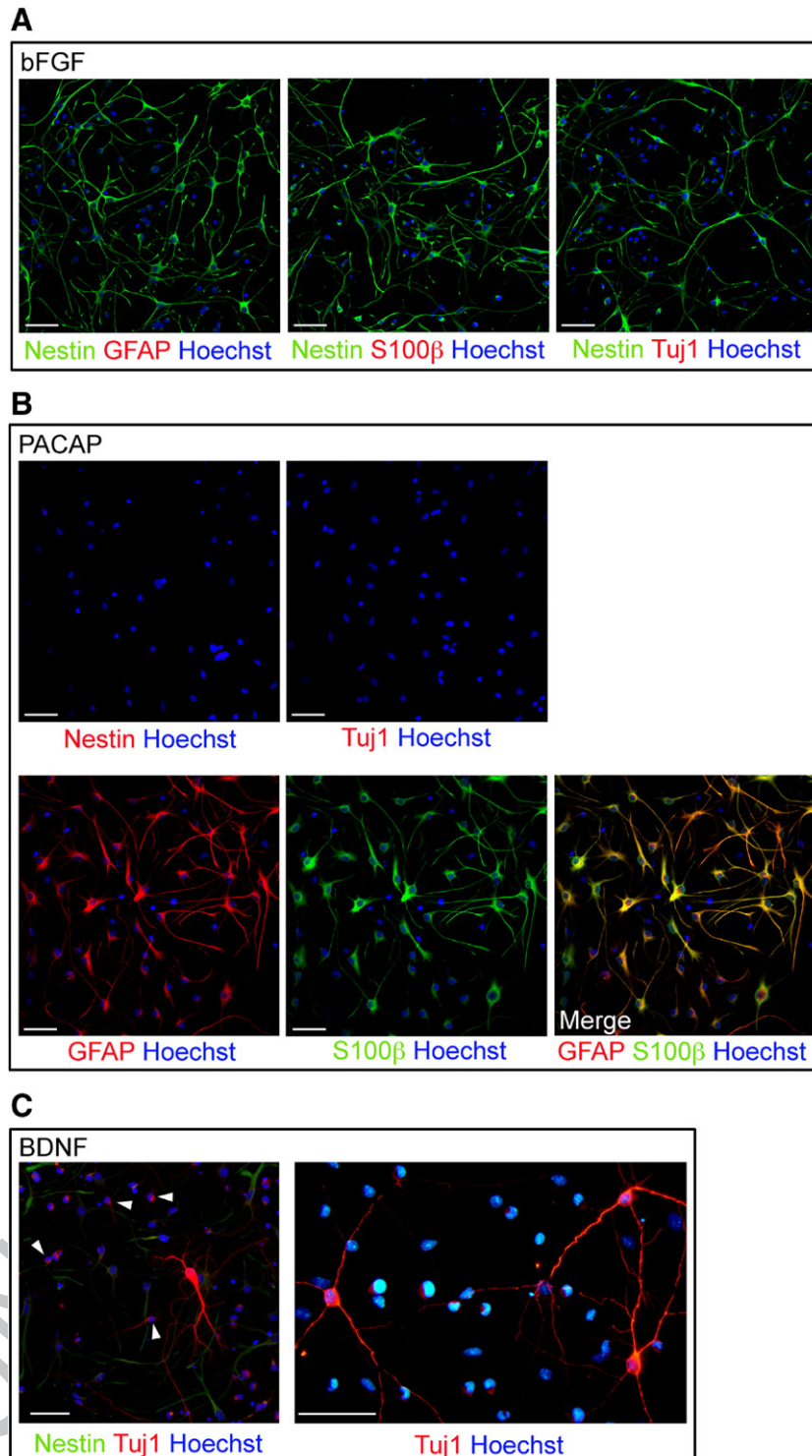


Fig. 1. PACAP triggers astrocyte differentiation from cortical precursor cells. (A) Control cells growing in the presence of bFGF (20 ng/ml) express the neural precursor marker nestin (green) but not the astroglial markers GFAP or S100β, nor the neuronal marker Tuj1. Rabbit polyclonal anti-Nestin antiserum was coincubated with either anti-GFAP, anti-S100β, or anti-Tuj1 monoclonal antibodies. (B) Cells exposed to PACAP (100 nM) express the astroglial markers GFAP (red) and S100β (green), but not nestin or the neuronal marker Tuj1. A rabbit polyclonal anti-GFAP antiserum was coincubated with the anti-S100β monoclonal antibody. (C) Differentiation of neurons from cortical precursor cells exposed to BDNF (50 ng/ml). Note that in most cells nestin expression (green) is downregulated. Cells showing initiation of neuronal differentiation indicated by the presence of Tuj1 (red) do not express nestin. Examples of these young neurons are indicated by arrowheads. Cells with more advanced degree of differentiation showing dendritic trees typical of fully differentiated neurons are observed. The right panel depicts a higher magnification field. Scale bar corresponds to 50 μm. In all cases cell nuclei have been counterstained with Hoechst 3342 (blue).

Results

Astrocyte differentiation and stimulation of GFAP gene expression by PACAP do not require protein kinase A activity

We have previously determined that treatment of primary cortical precursor cells obtained from the brains of rat fetuses of 17 days of gestational age (E17) with PACAP or with the cAMP analog 8Br-cAMP results in astrocyte differentiation and stimulates GFAP expression (Cebolla and Vallejo, 2006; McManus et al., 1999; Vallejo and Vallejo, 2002). To confirm those findings we carried out immunofluorescence experiments and determined that fetal primary cortical cells proliferating in the presence of basic fibroblast growth factor (bFGF) express the neural precursor marker nestin, but not the glial markers GFAP or S100 β , nor the neuronal marker Tuj1 (Fig. 1A). When cells were treated with PACAP, nestin expression was downregulated and expression of the astroglial markers GFAP and S100 β was induced (Fig. 1B). Exposure to PACAP did not induce expression of Tuj1 (Fig. 1B). However, when cells were treated with BDNF instead of PACAP, nestin expression was downregulated and Tuj1 expression was induced (Fig. 1C). Since coexpression of GFAP and S100 β is a feature of mature astrocytes (Rapin et al., 2007), these results confirm our previous data and show that PACAP induces astrocyte differentiation from cortical precursor cells prepared from the brains of rat fetuses.

erating in the presence of basic fibroblast growth factor (bFGF) express the neural precursor marker nestin, but not the glial markers GFAP or S100 β , nor the neuronal marker Tuj1 (Fig. 1A). When cells were treated with PACAP, nestin expression was downregulated and expression of the astroglial markers GFAP and S100 β was induced (Fig. 1B). Exposure to PACAP did not induce expression of Tuj1 (Fig. 1B). However, when cells were treated with BDNF instead of PACAP, nestin expression was downregulated and Tuj1 expression was induced (Fig. 1C). Since coexpression of GFAP and S100 β is a feature of mature astrocytes (Rapin et al., 2007), these results confirm our previous data and show that PACAP induces astrocyte differentiation from cortical precursor cells prepared from the brains of rat fetuses.

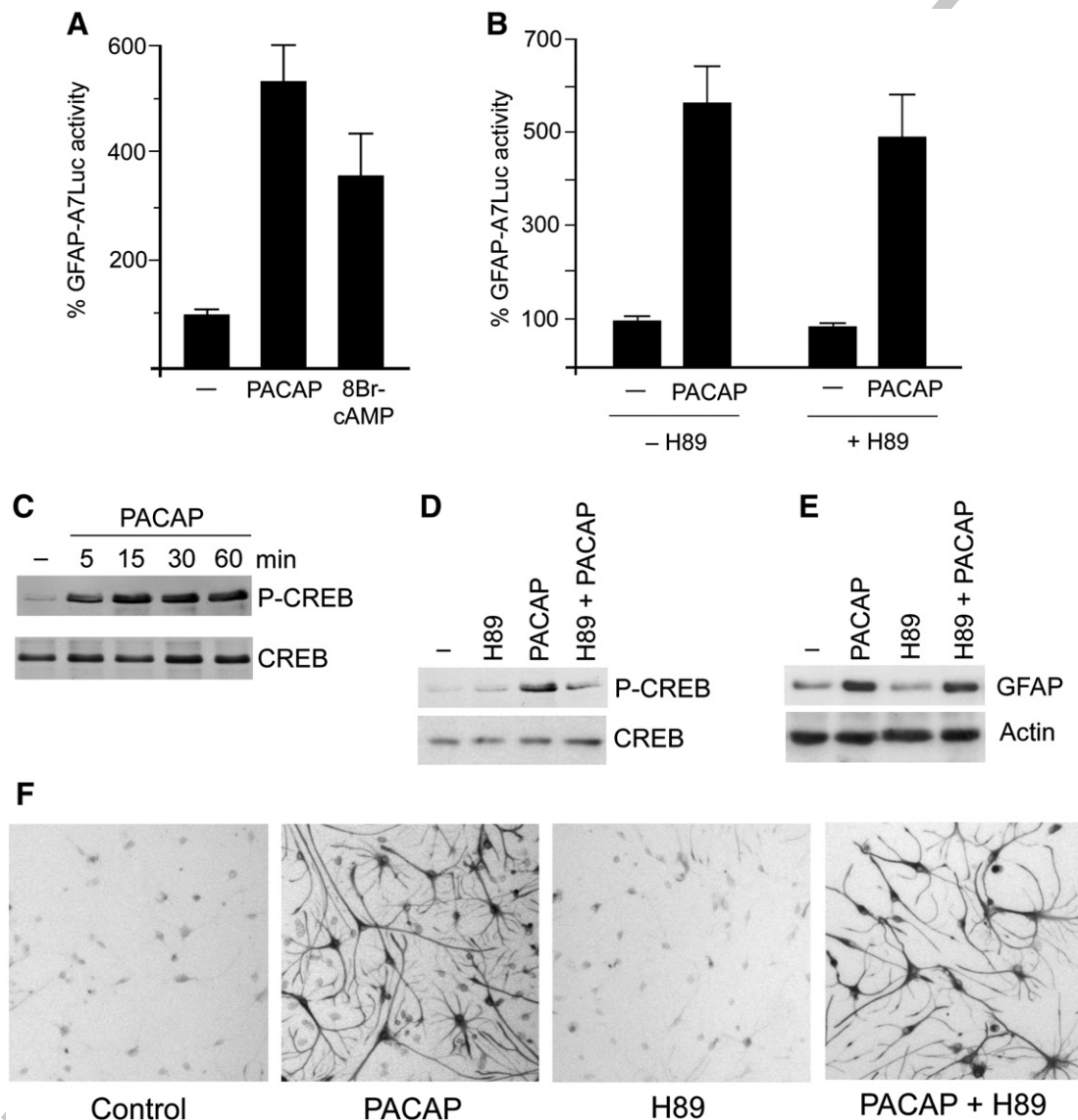


Fig. 2. Activation of PKA by PACAP is not involved in stimulation of GFAP expression during astrocyte differentiation. (A, B) Relative levels of luciferase activity elicited in primary cortical precursor cells transfected with the reporter plasmid GFAP-A7Luc. Cells were left untreated (—), or were treated with PACAP (100 nM), 8Br-AMP (1 mM), H89 (10 μ M) or a combination of H89 and PACAP. In this case, PACAP was added 15 min after the addition of H89. (C) Western immunoblot showing phosphorylation of CREB by exposure to PACAP (100 nM) for the indicated periods of time (upper panel). A specific anti-phospho-CREB antiserum was used. The use of an antiserum that does not discriminate between CREB and phospho-CREB (bottom panel) indicates that the total levels of CREB are not affected by exposure to PACAP. (D) Western immunoblot carried out with an anti-phospho-CREB antiserum showing inhibition of PACAP-induced CREB phosphorylation in the presence of the PKA inhibitor H89 (10 μ M). Primary cortical cells were exposed to PACAP (100 nM) for 5 min, and H89 (10 μ M) was added 15 min before PACAP. Total CREB immunoreactivity was used as a control to monitor even loading of samples. (E) Western immunoblot showing expression of GFAP in extracts of primary cortical cells treated with PACAP (100 nM), in the absence or presence of H89 (10 μ M) administered 15 min earlier. Cells were exposed to PACAP for 2 h and were harvested 2 days after the onset of treatment. Actin immunoreactivity was used as a control to monitor even loading of samples. (F) Immunocytochemical staining of GFAP in primary cortical cells treated with PACAP (100 nM), in the absence or presence of H89 (10 μ M) administered 15 min earlier. Cells were exposed to PACAP for 2 h and were processed for immunocytochemistry 2 days after the onset of treatment. Note that the presence of the PKA inhibitor H89 does not prevent GFAP expression (E) or astrocyte differentiation (F).

To monitor transcriptional responses of the GFAP gene promoter triggered by PACAP or 8Br-cAMP, we used transient transfections with GFAP-A7Luc, a GFAP-luciferase reporter plasmid that we have previously used to identify and characterize promoter elements in the GFAP gene (Cebolla and Vallejo, 2006). We found that the luciferase activity elicited by PACAP is mimicked by 8Br-cAMP (Fig. 2A), supporting the notion that cAMP production by PACAP is sufficient to stimulate transcription from the GFAP promoter. Thus, we initially asked whether activation of PKA is required for PACAP-induced transcriptional transactivation of the GFAP promoter. To this end, we carried out transfections in primary cortical cells that had been pretreated with the PKA-specific inhibitor H89. We found that H89 does not inhibit luciferase activity in response to treatment of cells with PACAP (Fig. 2B).

Although cAMP is synthesized in cells upon activation of PACAP receptors, it is known that PACAP can induce the activation of different intracellular signaling systems (Grimaldi and Cavalaro, 1999; Lu et al., 1998; Nicot and DiCicco-Bloom, 2001; Spengler et al., 1993; Vallejo and Vallejo, 2002). Therefore, in view of these results, we considered the possibility that PKA is not activated in neural precursor cells exposed to PACAP. However, we ruled out this possibility, because we observed that treatment of cells with PACAP readily resulted in the phosphorylation of CREB (Fig. 2C), a well known target of PKA, and this phosphorylation was inhibited by pretreatment with H89 (Fig. 2D).

We found also that pretreatment with H89 did not prevent stimulation of endogenous GFAP expression (Fig. 2E) and did not block astrocyte differentiation elicited by PACAP in primary cortical precursor cells (Fig. 2F). Thus, we conclude from these experiments that exposure of cortical precursor cells to PACAP results in activation of PKA, but PKA is not involved in the transcriptional transactivation of the GFAP promoter during astrocyte differentiation.

Since cAMP activity is required for astrocyte differentiation induced by PACAP (Vallejo and Vallejo, 2002), we argued that cAMP could activate additional signaling pathways different from PKA, and we turned our attention to investigate the possible involvement of the Epac-Rap1 and/or the CNrasGEF/Ras pathways.

Involvement of Epac-Rap1

To investigate whether PACAP-induced GFAP gene expression could be due to the specific activation of Epac-Rap1, we first determined whether treatment of primary cortical precursors with PACAP results in activation of Rap1. Activated Rap1 (Rap1-GTP) was assayed using a glutathione-S-transferase (GST) pull down assay with a fusion protein composed of GST and the Rap1 binding domain of RalGDS (GST-RalGDS-RBD), which specifically binds the active, GTP-bound form of Rap1, followed by western immunoblotting with a Rap1-specific antibody (de Rooij and Bos, 1997; Zwartkruis et al., 1998). We observed that treatment of primary cortical precursor cells with PACAP results in the activation of Rap1. The onset of this response is relatively slow, reaching maximum levels 15 min after exposure of cells to PACAP, and persisting for at least 30 min (Fig. 3A). As a positive control, we observed that Rap1 is activated by exposure for 15 min to 8CPT-2-O-Me-cAMP (Fig. 3A), a cAMP analog that is a selective activator of Epac (Enserink et al., 2002).

In addition, we tested whether the blockade of the PACAP-induced activation of the Epac-Rap1 pathway would affect the stimulation of GFAP promoter activity. For this purpose, we cotransfected primary cortical precursor cells with the reporter plasmid GFAP-A7Luc and an expression vector encoding Rap1N17, a dominant negative mutant of the Epac effector Rap1 (Vossler et al., 1997). We observed that in the presence of increasing amounts of Rap1N17, the stimulatory effect of PACAP on GFAP promoter activity decreased (Fig. 3B). In contrast, Rap1N17 did not prevent the stimulation of the GFAP promoter induced by CNTF (Fig. 3C), supporting the notion that the effect of

Rap1N17 is not due to toxicity and that the induction of GFAP promoter activity by PACAP in neural precursors involves the specific activation of the Epac-Rap1 pathway.

Based on these results, it could be expected that stimulation of Epac in cortical precursor cells should trigger astrocyte differentiation and induce GFAP expression by stimulating transcriptional activity of the GFAP promoter. To test this notion, we transfected primary cortical

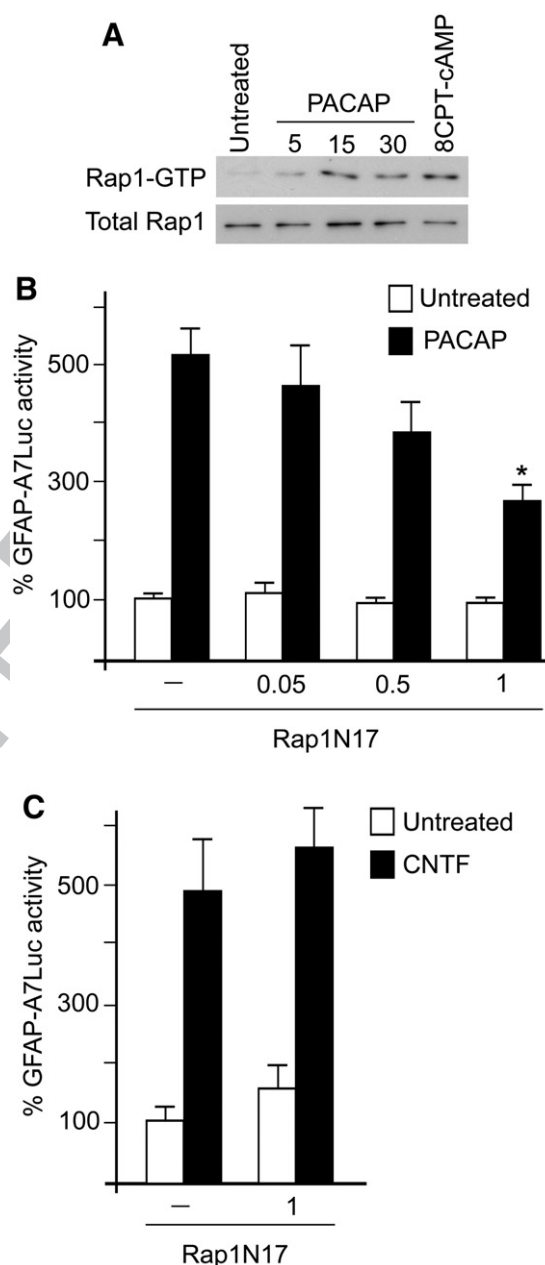


Fig. 3. Involvement of the activation of Rap1 in PACAP-induced stimulation of the GFAP promoter. (A) GST pull down assay showing activation of Rap1 (Rap1-GTP) in response to treatment of primary cortical precursor cells either with PACAP (100 nM) for the indicated periods of time (minutes), or with the cAMP analog 8CPT-2-O-Me-cAMP (8CPT-cAMP), a specific agonist for the activation of Epac. Cells were exposed to 8CPT-2-O-Me-cAMP (100 μM) for 15 min. (B) Relative luciferase activities elicited in primary cortical precursor cells cotransfected with the reporter plasmid GFAP-A7Luc and with the indicated amounts (μg) of an expression vector encoding Rap1N17, a dominant negative mutant of Rap1. Cells were left untreated (white columns), or treated (black columns) with PACAP (100 nM). * $p < 0.01$ relative to values obtained in PACAP-treated cells in the absence of Rap1N17 (Student's t -test). (C) A similar experiment to the one indicated in (B), but treating cells with CNTF (30 ng/ml) instead of PACAP.

precursors with the reporter plasmid GFAP-A7Luc, and treated them with the Epac-specific agonist 8CPT-2-O-Me-cAMP. We found that this treatment did not increase basal luciferase activity, indicating that this compound is not able to mimic the activity of PACAP or 8Br-cAMP on the GFAP promoter (Fig. 4A). In addition, in contrast with what we observed in the case of PACAP or 8Br-cAMP, exposure of primary cortical precursor cells to 8CPT-2-O-Me-cAMP did not induce endogenous GFAP expression or astrocyte differentiation, as assessed by western immunoblot and immunocytochemistry, respectively (Figs. 4B, C).

Taken together, these experiments suggest that activation of the Epac-Rap1 pathway is involved in the response to PACAP but it is not sufficient to stimulate GFAP promoter activity on its own. Since inhibition of intracellular signaling by a cAMP-specific antagonist blocks astrocyte differentiation induced by PACAP (Vallejo and Vallejo, 2002), we sought to investigate whether an additional cAMP-dependent pathway could be activated. For this reason, we studied the possible involvement of Ras, which can be activated via stimulation of the cAMP-dependent exchange factor CNrasGEF (Pham et al., 2000).

Involvement of Ras

To test whether PACAP can activate Ras in primary cortical precursor cells, we used a GST pull down assay with a fusion protein composed of GST and the Ras-binding domain of Raf1 (GST-Raf1-RBD), which specifically binds the active, GTP-bound form of Ras, followed by western immunoblotting with a Ras-specific antibody (Taylor and Shalloway, 1996). We found that PACAP transiently activates Ras within 5 min of treatment, and by 15 min the levels of GTP-bound Ras had practically returned to basal levels (Fig. 5A).

To test whether Ras activation is related to the effect of PACAP on GFAP gene expression, we cotransfected primary cortical precursor cells with GFAP-A7Luc and an expression vector encoding RasN17, a dominant negative mutant of Ras (Matallanas et al., 2003). Expression of RasN17 resulted in a marked, although incomplete inhibition of the luciferase activity induced by PACAP, but did not affect luciferase activity induced by CNTF (Figs. 5B, C), indicating that the effect of RasN17 is not due to toxicity. Thus, the activation of Ras on its own appears to be important for the stimulation of the GFAP gene promoter triggered by PACAP. Then, we sought to explore

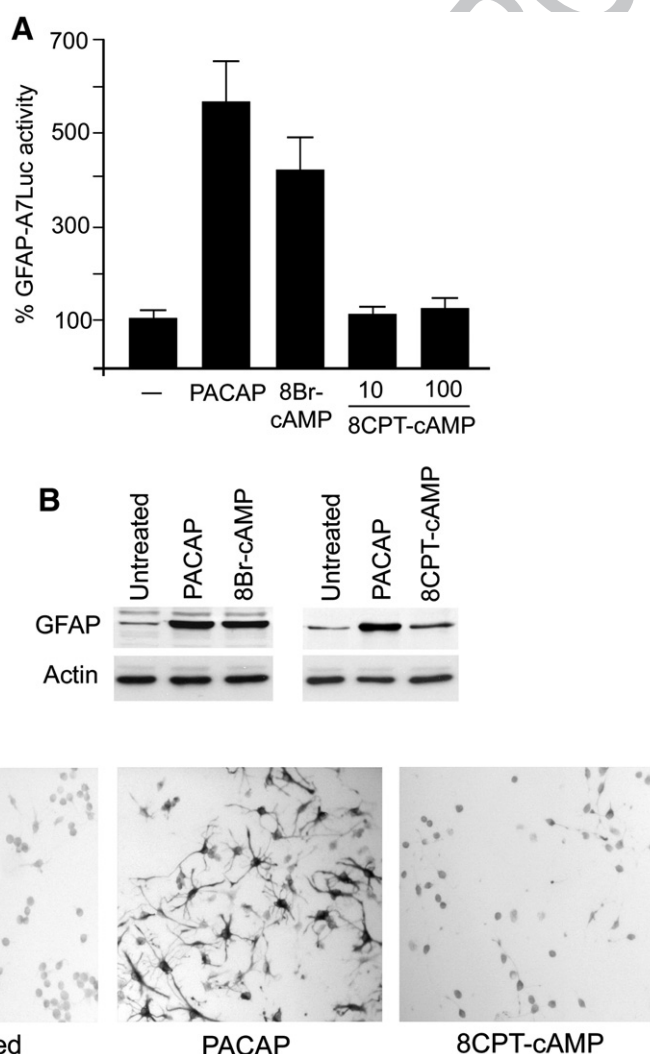


Fig. 4. Stimulation of Epac is not sufficient to induce GFAP gene expression during astrocyte differentiation. (A) Relative levels of luciferase activity elicited in primary cortical precursor cells transfected with the reporter plasmid GFAP-A7Luc. Cells were left untreated (–), or were treated with PACAP (100 nM), 8Br-cAMP (1 mM), or 8CPT-2-O-Me-cAMP (8CPT-cAMP, 10 or 100 μ M). (B) Western immunoblots carried out with extracts of primary cortical precursor cells showing induction of GFAP expression in cells treated with PACAP (100 nM) or 8Br-cAMP (1 mM), but not in those treated with 8CPT-2-O-Me-cAMP (8CPT-cAMP, 100 μ M). (C) Immunocytochemical staining of GFAP in primary cortical precursor cells induced to differentiate to astrocytes by treatment with PACAP (100 nM). Note that astrocyte differentiation was not induced in cells treated with 8CPT-2-O-Me-cAMP (8CPT-cAMP, 100 μ M).

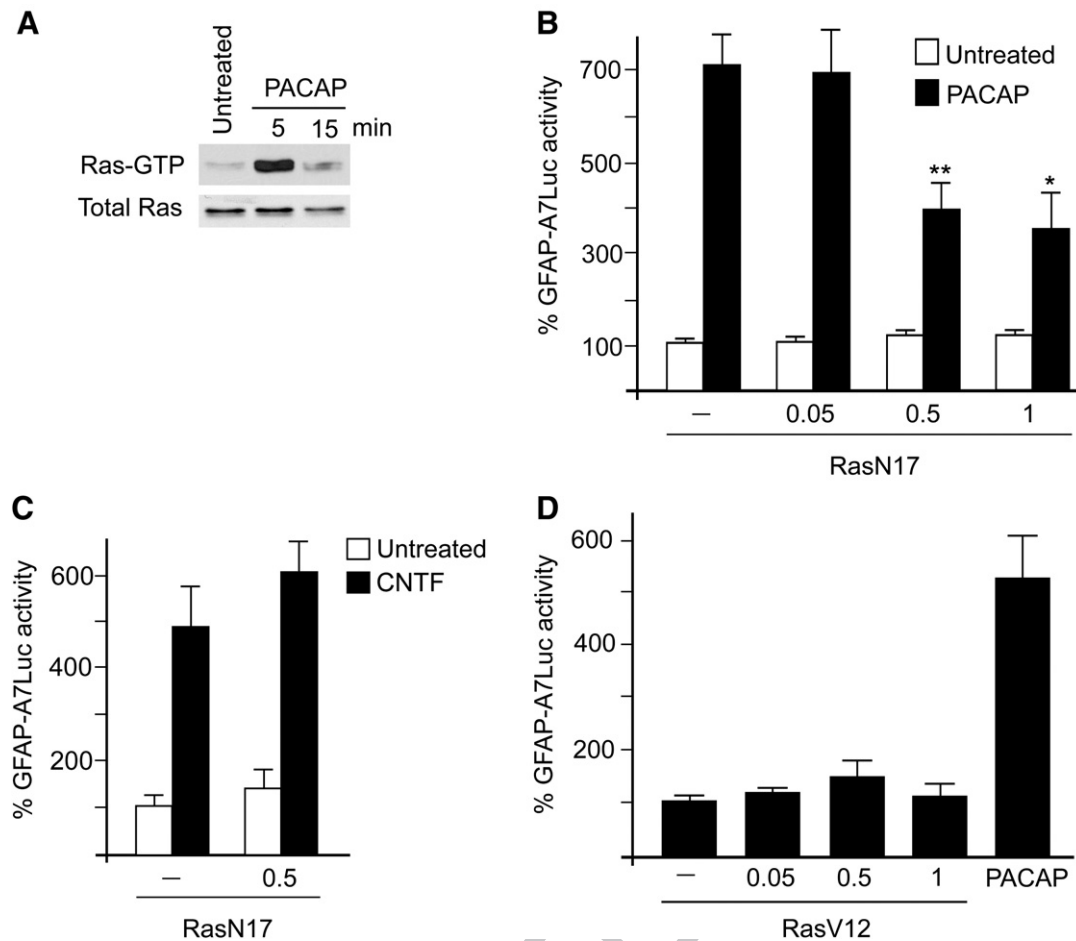


Fig. 5. Involvement of the activation of Ras in PACAP-induced stimulation of the GFAP promoter. (A) GST pull down assay showing activation of Ras (Ras-GTP) in response to treatment of primary cortical precursor cells with PACAP (100 nM) for the indicated periods of time. (B) Relative luciferase activities elicited in primary cortical precursor cells cotransfected with the reporter plasmid GFAP-A7Luc and with the indicated amounts (μg) of an expression vector encoding RasN17, a dominant negative mutant of Ras. Cells were left untreated (white columns), or were treated (black columns) with PACAP (100 nM). * $p=0.024$ and ** $p<0.02$, relative to values obtained in PACAP-treated cells in the absence of RasN17 (Student's *t*-test). (C) A similar experiment to the one indicated in (B), but treating cells with CNTF (30 ng/ml) instead of PACAP. (D) Relative luciferase activities elicited in primary cortical precursor cells cotransfected with the reporter plasmid GFAP-A7Luc and with the indicated amounts (μg) of an expression vector encoding RasV12, a constitutively active mutant of Ras. For comparison, the luciferase activity of cells transfected only with GFAP-A7Luc and treated with PACAP (100 nM) is shown.

whether activation of Ras is sufficient to stimulate transcription from the GFAP promoter using RasV12, a constitutively active mutant of Ras (Delgado et al., 2000). We observed that cotransfections of primary cortical precursors with the GFAP-A7Luc reporter and with increasing amounts of an expression vector encoding RasV12 did not alter luciferase activity significantly (Fig. 5D), indicating that activation of Ras is not sufficient to stimulate GFAP gene expression.

Ras can be activated by cAMP via stimulation of the nucleotide exchange factor CNrasGEF (Pham et al., 2000). Because no cAMP analogs that act specifically and selectively as CNrasGEF agonists have been developed, we tested the involvement of cAMP on the PACAP-induced activation of Ras indirectly. We have observed previously that the ability of PACAP to induce astrocyte differentiation from primary cortical precursors can be mimicked by 8Br-cAMP, and can be blocked by the cAMP antagonist Rp-cAMPS (McManus et al., 1999; Vallejo and Vallejo, 2002). In agreement with these findings, we observed that pretreatment of cells with Rp-cAMPS inhibits the activation of Ras induced by PACAP (Fig. 6A). In addition, in transfected cells, stimulation of GFAP-A7Luc activity elicited by treatment of cells with 8Br-cAMP was reduced in the presence of the dominant negative inhibitor RasN17 (Fig. 6B).

The experiments carried out using either the Rap1 inhibitor Rap1N17 or the Ras inhibitor RasN17 show that inhibition of the

transcriptional activity of the GFAP promoter stimulated by PACAP is not complete. Therefore, we tested the effects of the two negative dominant inhibitors together. In agreement with our previous results, PACAP-induced GFAP-A7Luc activity in transfected primary cortical precursor cells was reduced by about 40% in the presence of the Ras inhibitor (Fig. 7A). When both inhibitors were present together, PACAP-, but not CNTF-induced GFAP promoter activity was inhibited by more than 80% (Figs. 7A, B). In addition, we observed that knockdown of both Ras and Rap1 by RNA interference prevented the stimulation of endogenous GFAP expression induced by PACAP without affecting the stimulation induced by CNTF (Fig. 7C).

All of the above experiments indicate that activation of either Ras or Rap1 is not sufficient to stimulate the GFAP gene promoter, although both appear to be necessary for stimulation. This suggests that the expression of GFAP in neural precursor cells requires the coordinated activation of both signaling pathways. To test this notion, we cotransfected GFAP-A7Luc with the expression vector encoding RasV12 to stimulate the Ras-dependent pathway constitutively, and then treated the cells with 8CPT-2-O-Me-cAMP to stimulate the Epac-Rap1-dependent pathway. These experiments showed that 8CPT-2-O-Me-cAMP only activated luciferase activity when was RasV12 present, even though RasV12 had no effect on its own (Fig. 7D). Therefore,

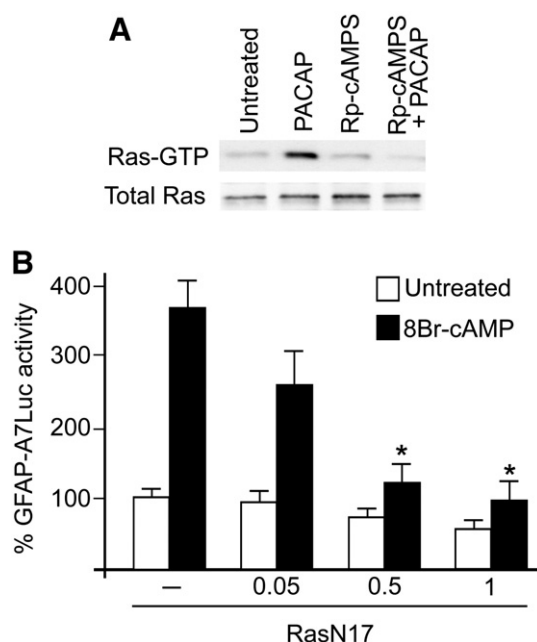


Fig. 6. Involvement of cAMP on the PACAP-induced activation of Ras. (A) GST pull down assay showing activation of Ras (Ras-GTP) in response to treatment of primary cortical precursor cells with PACAP (100 nM) for 5 min. Note that PACAP failed to activate Ras in the presence of the cAMP antagonist Rp-cAMPS (10 μM), which was administered 10 min before PACAP. (B) Relative luciferase activities elicited in primary cortical precursor cells cotransfected with the reporter plasmid GFAP-A7Luc and with the indicated amounts (μg) of an expression vector encoding RasN17, a dominant negative mutant of Ras. Cells were left untreated (white columns), or were treated (black columns) with the cAMP analog 8Br-cAMP (1 mM). * $p < 0.005$ relative to values obtained in 8Br-cAMP-treated cells in the absence of RasN17 (Student's *t*-test).

these experiments indicate that GFAP promoter stimulation require the concomitant activation of both Epac-Rap1- and Ras-dependent signaling pathways.

Discussion

Our previous work indicates that induction of astrogliogenesis and stimulation of GFAP gene expression by PACAP are due to activation of specific PAC1 type receptors expressed on cortical precursor cells and depend on the activation of signaling pathways that require cAMP (Vallejo and Vallejo, 2002). In the present study we show that stimulation of GFAP gene expression by PACAP in cortical precursors is associated to activation of the small GTPases Rap1 and Ras. Interestingly, isolated stimulation of Epac-Rap1 with a specific cAMP analog or constitutive activation of Ras alone is not sufficient to activate transcription from the GFAP promoter. Instead, we found that this response requires the coordinated activation of both signaling pathways. This is not entirely surprising in view of the number and complexity of interactions that mediate crosstalk between the different cAMP-dependent signaling cascades within cells (Stork and Schmitt, 2002). In addition, our data are in agreement with the observed lack of effects of a constitutively active isoform of Rap1 expressed in differentiating astrocytes of transgenic mice on astrocyte differentiation (Apicelli et al., 2003).

We observed that the activation of Rap1 is delayed and it is apparently weaker relative to that of Ras. Thus, it could be possible that activation of Rap1 requires previous activation of Ras, as has been shown to be the case in different cell types (Li et al., 2006). However, it is unlikely that activation of Rap1 in cortical precursors depends entirely on activation of Ras, because partial GFAP promoter stimulation is still observed in the presence of the dominant negative inhibitor RasN17.

Activation of Rap1 and/or Ras by PACAP has been shown in different cell types, including neuronal cells and astrocytes (Bouschet et al., 2003; Dasgupta et al., 2003; Obara et al., 2007; Romano et al., 2003). In pituitary cells, PACAP-induced transactivation of the prolactin gene promoter is also accompanied of the activation of Rap1 and Ras (Romano et al., 2003). However, in this case the activations of these signaling pathways have antagonistic effects: whereas Rap1 stimulates transcription, Ras inhibits prolactin gene promoter activity. In PC12 and in cerebellar granule cells stimulation of ERKs by PACAP requires that both Rap1 and Ras are activated (Bouschet et al., 2003; Obara et al., 2007). Interestingly, the activation of these small GTPases by PACAP in cerebellar cells requires the activation of PKA by cAMP (Obara et al., 2007).

We found that PACAP is able to activate PKA in cortical precursor cells, and that this activation is responsible for phosphorylation of CREB. Studies carried out in pituitary cells indicate that PACAP, acting on PAC1-type receptors, induces transcription of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene by stimulating promoter activity via phosphorylation of CREB by cAMP-dependent PKA (Pincas et al., 2001). However, in cortical precursor cells we found that the stimulation of promoter activity of the GFAP gene is independent of the activation of PKA, because PACAP induces GFAP expression and triggers astrocyte differentiation even in the presence of a PKA inhibitor. Since inhibition of either Rap1 or Ras results in decreased PACAP-induced GFAP promoter activity, it follows that PKA is not required for the activation of Rap1 or Ras in these cells. In addition, the observation that PKA activation and CREB phosphorylation do not participate in PACAP-induced GFAP gene expression is consistent with the observation that the region of the GFAP promoter that mediates cAMP-dependent transactivation does not contain any sequence corresponding to a typical cAMP-response element for binding of CREB-like proteins (BC and MV, unpublished). A detailed characterization of the GFAP promoter region that confers responsiveness to PACAP/cAMP has been carried out in our laboratory and will be reported elsewhere.

In mature astrocytes, PACAP/cAMP signaling leads to activation of Rap1, but as a consequence Ras is inhibited (Apicelli et al., 2003; Dasgupta et al., 2003; Dugan et al., 1999), in agreement with previous studies showing that inhibition of the Ras/Raf1 pathway by Rap1 is dependent on cAMP activation of PKA (Altschuler et al., 1995; Schmitt and Stork, 2001). In contrast, in glial progenitors we observed that both Rap1 and Ras are activated by PACAP. It is known that PACAP acts on PAC1 receptors expressed in cortical cells, but it exerts different actions depending on their developmental stage. Thus, before birth PACAP promotes neuronal differentiation from early neural precursors (Suh et al., 2001) and astrogliogenesis from late precursors (Nishimoto et al., 2007; Vallejo and Vallejo, 2002), whereas postnatally, PACAP regulates the growth and differentiation of oligodendrocyte progenitors (Lee et al., 2001). Therefore the signaling mechanisms on which PACAP acts during cortical development appear to differ in different cell lineages and to be developmentally regulated. This developmental regulation could be due to the differential expression of effector proteins such as B-Raf, activated by Rap1, that is not expressed in mature astrocytes (Dugan et al., 1999). In addition, the generation of different PAC1 receptor splice variants in cortical precursors (Vallejo and Vallejo, 2002) could be responsible for the coupling to different signaling pathways.

It is known that astrocytes derive sequentially from the same precursor cells that first generate neurons (Barnabé-Heider et al., 2005; Miller and Gautier, 2007; Qian et al., 2000). We found that PACAP does not induce neuronal differentiation from E17 precursors, although earlier reports suggest that PACAP can induce neuronal differentiation from E13.5 precursor cells (Lu and DiCicco-Bloom, 1997). In turn, we have observed that PACAP is unable to induce astrocyte differentiation from E14 cortical precursors (our unpublished observations). The molecular mechanisms that may explain

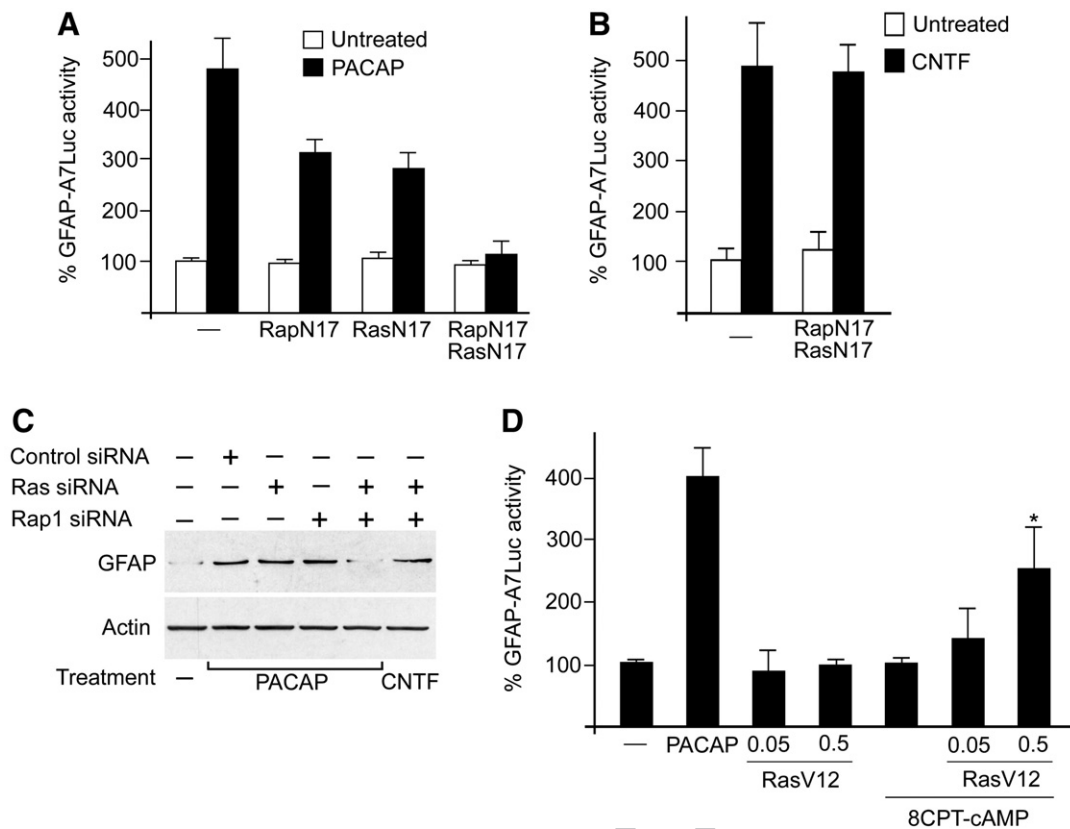


Fig. 7. (A) Relative luciferase activities elicited in primary cortical precursor cells cotransfected with the reporter plasmid GFAP-A7Luc and with expression vectors encoding Rap1N17 (1 μg) or RasN17 (0.5 μg). Cells were left untreated (white columns), or were treated (black columns) with the PACAP (100 nM). Note that when both dominant negative inhibitors are present at the same time the effect of PACAP on the GFAP promoter activity is almost completely inhibited. (B) A similar experiment to the one indicated in (A), but treating cells with CNTF (30 ng/ml) instead of PACAP. (C) Western immunoblot showing endogenous GFAP expression in cells transfected with siRNA for Rap1 and Ras as indicated on top. Note that the presence of siRNA for both Rap1 and Ras at the same time specifically prevents stimulation of GFAP expression by PACAP but not by CNTF. Actin immunoreactivity was used as a control to monitor even loading of samples. (D) Relative luciferase activities elicited in primary cortical precursor cells cotransfected with the reporter plasmid GFAP-A7Luc and with the indicated amounts (μg) of an expression vector encoding RasV12. Some cells were treated with 8CPT-2-O-Me-cAMP (8CPT-cAMP, 100 μM). For comparison, the first two bars to the left depict the increase in luciferase activity observed in cells transfected only with GFAP-A7Luc and treated with PACAP (100 nM). **p* < 0.05, relative to values obtained in 8CPT-2-O-Me-cAMP-treated cells in the absence of RasV12 (Student's *t*-test).

these differential effects of PACAP on cortical precursors are unknown. However, there is evidence for the existence of silencing mechanisms that prevent the inappropriate onset of astrocyte differentiation and GFAP expression before neurogenesis is completed even in the presence of astrogliogenic signals; and in turn, the acquisition of competence to generate astrocytes is accompanied by the coordinate inhibition of the neurogenic potential of precursor cells (Fan et al., 2005; Hermanson et al., 2002; Müller and Gauthier, 2007; Nieto et al., 2001; Park et al., 1999; Qian et al., 1997; Song and Ghosh, 2004; Sun et al., 2001; Takizawa et al., 2001; Viti et al., 2003).

Our results show that the activation of Ras by PACAP in cortical precursor cells requires cAMP, because it can be efficiently blocked by the cAMP antagonist Rp-cAMPS. Furthermore, the activation of Ras by cAMP is also supported by our experiments showing that the transcriptional effects of 8Br-cAMP on the GFAP promoter can be significantly reduced by the dominant negative mutant RasN17. It is unlikely that the inhibition of Ras activation by Rp-cAMPS is due to inhibition of PKA, because inhibition of PKA by H89 does not affect the response to PACAP in terms of GFAP promoter stimulation and astrocyte differentiation. Since the cAMP antagonist Rp-cAMPS can block the cAMP-dependent activation of small GTPases such as Epac in addition to blocking PKA (Rehmann et al., 2003; Van Haastert et al., 1984), it is possible that the effect of the cAMP antagonist on the activation of Ras by PACAP could be due to direct blockade of a Ras-associated GTPase such as CNrasGEF. This GTPase can activate Ras in a PKA-independent manner upon treatment with 8Br-cAMP (Amsen et al., 2006; Pham et al.,

2000) or in response to elevation of intracellular cAMP levels following ligand-dependent stimulation of β1 adrenergic receptors (Pak et al., 2002), which are seven transmembrane domain G protein-coupled receptors similar to PAC1 receptors for PACAP.

The molecular mechanisms by which PACAP and cAMP stimulate transcription of the GFAP gene during astrocyte differentiation are unknown. Ongoing studies in our laboratory indicate that they may involve changes in the intracellular concentrations of calcium ions. In different cell types, activation of Ras or Epac can lead to changes in intracellular calcium concentrations (Fitzgerald, 2000; Kang et al., 2003; Ster et al., 2007). Thus, cAMP production following PACAP activation of PAC1 receptors in cortical precursor cells triggers the stimulation of Rap1- and Ras-dependent intracellular signaling cascades that could include changes in the concentrations of calcium ions. These changes would lead to stimulation of transcriptional activity of the GFAP gene during the process of astrocyte differentiation.

Experimental methods

Reagents

CNTF and bFGF were from PeproTech EC Ltd. (London, England). PACAP-38, H-89, and 8-Br-cAMP were obtained from Sigma Chemical Co. (Madrid, Spain). 8CPT-2-O-Me-cAMP was purchased from Biolog Life Science Institute (Bremen, Germany).

Plasmids

The luciferase reporter plasmid GFAP-A7Luc bearing a region of the rat GFAP gene promoter corresponding to nucleotides -1546 to +13 relative to the transcription initiation site has been described in detail in previous studies (Bonni et al., 1997; Cebolla and Vallejo, 2006; Krohn et al., 1999). The plasmids pGEX-Raf1-RBD encoding GST-Raf1-RBD, and those encoding RasN17 and RasV12 were provided by Dr. P. Crespo (Universidad de Cantabria, Santander, Spain) and have been described (Matallanas et al., 2003). pGEX-RalGDS-RBD encoding GST-RalGDS-RBD and the expression vector for Rap1N17 (Vossler et al., 1997) were provided by Dr. L. Cacicado (Hospital Ramon y Cajal, Madrid) with permission from Dr. P.J.S. Stork (Vollum Institute, Portland, Oregon).

Cell culture and transfections

Primary cortical cell cultures were prepared from the cerebral cortex dissected from fetal brains of E17 Wistar rats as described (Vallejo and Vallejo, 2002). Briefly, cell suspensions prepared by trituration of the fetal cortex were washed and resuspended in serum-free DMEM containing N1 supplement (Sigma) and 1 mM sodium pyruvate (defined medium). Basic FGF (20 ng/ml) was added and cells were seeded into 10 cm dishes coated with poly-ornithine, at a density of $2\text{--}4 \times 10^4$ cells/cm². Cells were incubated for expansion at 37 °C for 3–4 days. Medium was replaced every 2 days.

Differentiation experiments were carried out with cells plated into 35 mm dishes at a density of 5×10^4 cells/cm². After incubation at 37 °C for 24 h, bFGF-containing medium was replaced with bFGF-free defined medium, and PACAP (100 nM), 8CPT-2-O-Me-cAMP (100 μM) or BDNF (50 ng/ml) were immediately added. After the addition of these compounds cells were incubated for 2–5 days, at the end of which they were processed for immunocytochemistry or immunofluorescence. To evaluate the possible involvement of PKA activation during astrocyte differentiation, exposure to PACAP was limited to 2 h, since we have previously established that this period of time is sufficient to trigger differentiation (Vallejo and Vallejo, 2002). After this time the medium was replaced and cells were cultured in defined medium until harvesting. In this case, H89 (10 μM) was added 15 min before PACAP.

For transfections, 10^6 cells/plate were seeded into poly-ornithine-coated 60 mm dishes. After an overnight incubation in defined medium in the presence of bFGF (20 ng/ml), the medium was removed and 3 μg of reporter plasmid DNA mixed with 10 μl FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche) were added in 4 ml defined medium and incubated for 4 h. After this, the medium-DNA mix was removed and substituted with fresh defined medium, or with defined medium containing different compounds for treatments as indicated. In cotransfection experiments, expression vectors were added at the indicated amounts, and total DNA amount was kept constant by addition of empty vector. Luciferase activity and normalization of values were determined using a commercial assay system (Promega) 48 h after transfection exactly as described (Cebolla and Vallejo, 2006). Transfection of RSV-Luc was used as an independent standard for normalization, and efficiencies were corrected by using the Renilla luciferase assay system (Promega). All the values are expressed as mean ± s.e.m. of at least five independent experiments carried out in duplicates.

Western blot

Whole cell extracts from primary cells were prepared and proteins (20 μg) were resolved by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. GFAP and β-actin immunoreactivities were detected with specific monoclonal antibodies, (clone G-A-5, 1:10,000 dilution; and clone AC-15, 1:10,000 dilution, respectively; Sigma) followed by

incubation with a horse anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000 dilution) (BioRad, Hercules, CA). Rabbit polyclonal primary antisera were used for immunodetection of CREB (Santa Cruz, used at 1:2000 dilution) and phospho-CREB (Upstate, used at 1:1000 dilution). Incubations with these antisera were followed by incubation with a goat anti-rabbit peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000 dilution) (BioRad, Hercules, CA). Immunoreactive bands were visualized using an enhanced chemiluminescence detection system (ECL, Amersham, Buckinghamshire, England).

Endogenous Rap1 and Ras activation assay

Activated Rap1 (Rap1-GTP) or activated Ras (Ras-GTP) were detected using glutathione-S-transferase (GST) pull down assays as described (de Rooij and Bos, 1997; Taylor and Shalloway, 1996; Zwartkruis et al., 1998). Cells were washed twice with ice-cold PBS and then they were incubated at 4 °C for 10 min in 0.5 ml of lysis buffer containing: 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EGTA, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 1% N-octylglucoside, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Lysates were clarified by centrifugation at 10,000 g for 10 min, and 1 mg of total proteins from the supernatants were incubated with glutathione-sepharose beads (Amersham Biosciences). The beads were freshly coupled to GST-RalGDS-RBD to isolate Rap1-GTP, or to GST-Raf1-RDB to isolate Ras-GTP. Protein complexes were allowed to form for 1 h at 4 °C, after which the beads were washed three times with lysis buffer and resuspended in Laemmli's sample buffer. Denatured proteins were resolved by SDS-PAGE (12%), transferred to nitrocellulose membranes, and detected by western immunoblot using an affinity purified rabbit polyclonal anti-Rap1 antiserum (Santa Cruz Biotechnology; 1:1000 dilution) or a mouse monoclonal anti-Ras antiserum (Oncogene Research Products, San Diego, California; 1:1000 dilution). Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, Buckinghamshire, England).

Immunocytochemistry and immunofluorescence

DAB immunocytochemistry for GFAP was carried out with cells plated into poly-ornithine-coated 35 mm tissue culture dishes, using a specific monoclonal antibody (1:500 dilution) (clone G-A-5, Sigma) exactly as described (Vallejo and Vallejo, 2002). Immunodetection was carried out using immunoperoxidase staining with a Vectastain ABC kit (Vector Laboratories).

For immunofluorescence, cells were grown on glass coverslips and fixed. Primary antibodies used were anti-GFAP monoclonal antibody (1:500 dilution, Sigma), anti-S100β monoclonal antibody (1:500 dilution, Sigma), rabbit polyclonal anti-Nestin antiserum (1:4000 dilution) (McManus et al., 1999), and anti-Tuj1 monoclonal antibody (1:500 dilution, Sigma). In the case of double GFAP-S100β immunofluorescence, a rabbit polyclonal anti-GFAP antiserum (1:200 dilution, Dako) was used. Secondary antibodies were Alexa-488 or Alexa-546 donkey anti-rabbit or donkey anti-mouse (Molecular Probes) used at 1:500 dilution. Nuclei were counterstained with Hoechst 3342 (Invitrogen). Digital images were taken using a Leica TCS SP5 confocal microscope, except those corresponding to experiments with BDNF, in which case a Nikon 90i microscope equipped with a digital camera was used.

RNA interference

RNA interference was carried out using double stranded RNA duplexes transfected into primary cortical cells from the cerebral cortex of E17 Wistar rats prepared as described above. Cells (2×10^6 per plate) cultured into 60 mm dishes were incubated in 1.5 ml DMEM and transfected by adding a mixture containing 5 μl Lipofectamine

(Invitrogen), 500 µl OptiMEM (Invitrogen) and small interfering RNA (siRNA). After incubation for 6 h, the medium-siRNA mix was removed and substituted with fresh defined medium. Forty eight hours later, cells were treated with PACAP (100 nM) or CNFT (30 ng/ml) for another 24 h, after which GFAP expression was assayed by western immunoblot. The sequences of the custom siRNA duplexes (Stealth™ RNAi system, Invitrogen) used are as follows (only sense strand is indicated):

H-Ras, CCAAGUCCUUUGAAGACAUACAUC;
K-Ras, GAAUAAGUGUGACUUGCCUUCUAGA;
N-Ras, UGGCCAAGAGUUAUGGAAUCCAUI;
Rap1a, CAGAAUUUAGCAAGACAGUGGUGUA;
Rap1b, CAGCCAUGAGAGAUUGUACAUGAA.

A commercially available Stealth™ RNAi negative control duplex with medium (48%) GC content (Invitrogen) was used. Cells were transfected with a mixture of siRNAs for the three Ras isoforms, a mixture of siRNAs for the two Rap1 isoforms, or a mixture of siRNAs for all Ras and Rap1 isoforms. Each siRNA duplex was used at a concentration of 80 nM. The total concentration of siRNA (400 nM) was kept constant in all transfections by adding the negative control siRNA to the mixture as necessary. Transfection efficiency was assessed by a fluorescein-labeled siRNA (Invitrogen) and estimated to be greater than 90%.

Acknowledgments

This work was funded by grants from the Community of Madrid (GR/SAL/0774/2004) and Spanish Ministry of Education and Science (BMC2002-00870 and BFU2005-02052). I.L.B. and B.C. were supported by fellowships from the Community of Madrid. A.F.P. was supported by a fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science. We thank Piero Crespo, Philip Stork and Lucinda Cacicado for plasmids.

References

Altschuler, D.L., Peterson, S.N., Ostrowski, M.C., Lapetina, E.G., 1995. Cyclic AMP-dependent activation of Rap1b. *J. Biol. Chem.* 270, 10373–10376.

Amsen, E.M., Pham, N., Pak, Y., Rotin, D., 2006. The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF regulates melanogenesis and cell survival in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 281, 121–128.

Apicelli, A.J., Uhlmann, E.J., Baldwin, R.L., Dong, D., Nagy, A., Guha, A., Gutman, D.H., 2003. Role of the Rap1 GTPase in astrocyte growth regulation. *Glia* 42, 225–234.

Barnabé-Heider, F., Wasylnka, J.A., Fernandes, K.J.L., Porsche, C., Sendtner, M., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2005. Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1. *Neuron* 48, 253–265.

Bonni, A., Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Bhatt, A., Frank, D.A., Rozovsky, I., Stahl, N., Yancopoulos, G.D., Greenberg, M.E., 1997. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278, 477–483.

Bos, J.L., 2003. Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 733–738.

Bouschet, T., Perez, V., Fernandez, C., Bockaert, J., Eychene, A., Journot, L., 2003. Stimulation of the ERK pathway by GTP-loaded Rap1 requires the concomitant activation of Ras, protein kinase C, and protein kinase A in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 278, 4778–4785.

Bugba, L., Gadiant, R.A., Kwan, K., Stewart, C.L., Patterson, P.H., 1998. Analysis of neuronal and glial phenotypes in brains of mice deficient in leukemia inhibitory factor. *J. Neurobiol.* 36, 509–524.

Cebolla, B., Vallejo, M., 2006. Nuclear factor-1 regulates glial fibrillary acidic protein gene expression in astrocytes differentiated from cortical precursor cells. *J. Neurochem.* 97, 1057–1070.

Dasgupta, B., Dugan, L.L., Gutmann, D.H., 2003. The neurofibromatosis 1 gene product neurofibromin regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-mediated signaling in astrocytes. *J. Neurosci.* 23, 8948–8954.

de Rooij, J., Bos, J.L., 1997. Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene* 14, 623–625.

Delgado, M.D., Vaque, J.P., Arozarena, I., Lopez-Illasaca, M.A., Martinez, C., Crespo, P., Leon, J., 2000. H-, K- and N-Ras inhibit myeloid leukemia cell proliferation by a p21WAF1-dependent mechanism. *Oncogene* 19, 783–790.

Dugan, L.L., Kim, J.S., Zhang, Y., Bart, R.D., Sun, Y., Holzman, D.M., Gutmann, D.H., 1999. Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-Raf. *J. Biol. Chem.* 274, 25842–25848.

Enserink, J.M., Christensen, A.E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H.G., Doskeland, S.O., Blank, J.L., Bos, J.L., 2002. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat. Cell Biol.* 4, 901–906.

Fan, G., Martinowich, K., Chin, M.H., He, F., Fouse, S.D., Hutnick, L., Hattori, D., Ge, W., Shen, Y., Wu, H., ten Hoeve, J., Shuai, K., Sun, Y.E., 2005. DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development* 132, 3345–3356.

Fitzgerald, E.M., 2000. Regulation of voltage-dependent calcium channels in rat sensory neurones involves a Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Physiol.* 527, 433–444.

Gomes, W.A., Mehler, M.F., Kessler, J.A., 2003. Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Dev. Biol.* 255, 164–177.

Grimaldi, M., Cavaloro, S., 1999. Functional and molecular diversity of PACAP/VIP receptors in cortical neurons and type I astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2767–2772.

Gross, R.E., Mehler, M.F., Mabie, P.C., Zang, Z., Santschi, L., Kessler, J.A., 1996. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 17, 595–606.

He, F., Ge, W., Martinowich, K., et al., 2005. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astrogliogenesis. *Nat. Neurosci.* 8, 616–625.

Hermanson, O., Jepsen, K., Rosenfeld, M.G., 2002. N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature* 419, 934–939.

Kang, G., Joseph, J.W., Chepur, O.G., Monaco, M., Wheeler, M.B., Bos, J.L., Schwede, F., Genieser, H.G., Holz, G.G., 2003. Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic β-cells. *J. Biol. Chem.* 278, 8279–8285.

Koblar, S.A., Turnley, A.M., Classon, B.J., Reid, K.L., Ware, C.B., Cheema, S.S., Murphy, M., Bartlett, P.F., 1998. Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3178–3181.

Krohn, K., Rozovsky, I., Wals, P., Teter, B., Anderson, C.P., Finch, C.E., 1999. Glial fibrillary acidic protein transcription responses to transforming growth factor-β1 and interleukin-1β are mediated by a nuclear factor-1-like site in the near-upstream promoter. *J. Neurochem.* 72, 1353–1361.

Lee, M., Lelievre, V., Zhao, P., et al., 2001. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates DNA synthesis but delays maturation of oligodendrocyte progenitors. *J. Neurosci.* 21, 3849–3859.

Li, Y., Asuri, S., Rebhun, J.F., Castro, A.F., Paravinita, N.C., Quilliam, L.A., 2006. The Rap1 guanine nucleotide exchange factor, Epac2, couples cyclic AMP and Ras signals at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 281, 2506–2514.

Lu, N., DiCicco-Bloom, E., 1997. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an autocrine inhibitor of mitosis in cultured cortical precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3357–3362.

Lu, N., Zhou, R., DiCicco-Bloom, E., 1998. Opposing mitogenic regulation by PACAP in sympathetic and cerebral cortical precursors correlates with differential expression of PACAP receptor (PAC1-R) isoforms. *J. Neurosci. Res.* 53, 651–662.

Matallanas, D., Arozarena, I., Berciano, M., Aaronson, D.S., Pellicer, A., Lafarga, M., Crespo, P., 2003. Differences on the inhibitory specificities of H-Ras, K-Ras, and N-Ras (N17) dominant negative mutants are related to their membrane microlocalization. *J. Biol. Chem.* 278, 4572–4581.

McManus, M., Chen, L.C., Vallejo, I., Vallejo, M., 1999. Astroglial differentiation of cortical precursor cells triggered by activation of the cAMP-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* 19, 9004–9015.

Miller, F.D., Gauthier, A.S., 2007. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 54, 357–369.

Nakashima, K., Wiese, S., Yanagisawa, M., et al., 1999a. Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J. Neurosci.* 19, 5429–5434.

Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., Taga, T., 1999b. Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284, 479–482.

Nicot, A., DiCicco-Bloom, E., 2001. Regulation of neuroblast mitosis is determined by PACAP receptor isoform expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4758–4763.

Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O., Guillemot, F., 2001. Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29, 401–413.

Nishimoto, M., Furuta, A., Aoki, S., Kudo, Y., Miyakawa, H., Wada, K., 2007. PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells. *Glia* 55, 317–327.

Obara, Y., Horgan, A., Stork, P.J.S., 2007. The requirement of Ras and Rap1 for the activation of ERKs by cAMP, PACAP, and KCl in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 101, 470–482.

Ochiai, W., Yanagisawa, M., Takizawa, T., Nakashima, K., Taga, T., 2001. Astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells involving cardiotrophin-1-induced activation of STAT3. *Cytokine* 14, 264–271.

Pak, Y., Pham, N., Rotin, D., 2002. Direct binding of the β1 adrenergic receptor to the cyclic AMP-dependent guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF leads to Ras activation. *Mol. Cell Biol.* 22, 7942–7952.

Park, J.K., Williams, B.P., Alberta, J.A., Stiles, C.D., 1999. Bipotent cortical progenitor cells process conflicting cues for neurons and glia in a hierarchical manner. *J. Neurosci.* 19, 10383–10389.

Pham, N., Cheglakov, I., Koch, C.A., de Hoog, C.L., Moran, M.F., Rotin, D., 2000. The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates Ras in response to cAMP and cGMP. *Curr. Biol.* 10, 555–558.

Pincas, H., Laverriere, J.N., Counis, R., 2001. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate stimulate the promoter

- activity of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene via a bipartite response element in gonadotrope-derived cells. *J. Biol. Chem.* 276, 23562–23571.
- Qian, X., Davis, A.A., Goderie, S.K., Temple, S., 1997. FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* 18, 81–93.
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, A., Davis, A.A., Temple, S., 2000. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28, 69–80.
- Rajan, P., McKay, R.D.G., 1998. Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J. Neurosci.* 18, 3620–3629.
- Raponi, E., Agenes, F., Delphin, C., Assard, N., Baudier, J., Legraverend, C., Deloulme, J.C., 2007. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* 55, 165–177.
- Rehmann, H., Schwede, F., Dosjeland, S.O., Wittinghofer, A., Bos, J.L., 2003. Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J. Biol. Chem.* 278, 38548–38556.
- Romano, D., Magalon, K., Ciampini, A., Talet, C., Enjalbert, A., Gerard, C., 2003. Differential involvement of the Ras and Rap1 small GTPases in vasoactive intestinal and pituitary adenyl cyclase activating polypeptides control of the prolactin gene. *J. Biol. Chem.* 278, 51386–51394.
- Sauvageot, C.M., Stiles, C.D., 2002. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 244–249.
- Schmitt, J.M., Stork, P.J.S., 2001. Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein rap1. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3671–3683.
- Song, M.R., Ghosh, A., 2004. FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat. Neurosci.* 7, 229–235.
- Spengler, D., Waeber, C., Pantaloni, C., Florian, H., Bockaert, J., Seeburg, P.H., Journot, L., 1993. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365, 170–175.
- Ster, J., De Bock, F., Guérineau, N.C., Janossy, A., Barrère-Lemaire, S., Bos, J.L., Bockaert, J., Fagni, L., 2007. Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca^{2+} -dependent K^+ channels in cerebellar neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 2519–2524.
- Stork, P.J.S., Schmitt, J.M., 2002. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* 12, 258–266.
- Suh, J., Lu, N., Nicot, A., Tatsuno, I., DiCicco-Bloom, E., 2001. PACAP is an anti-mitogenic signal in developing cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* 4, 123–124.
- Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M.Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., Greenberg, M.E., 2001. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365–376.
- Takizawa, T., Nakashima, K., Namiyama, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa, M., Fujita, N., Nakao, M., Taga, T., 2001. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev. Cell* 1, 749–758.
- Taylor, S.J., Shalloway, D., 1996. Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr. Biol.* 6, 1621–1627.
- Vallejo, I., Vallejo, M., 2002. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces astrocyte differentiation of precursor cells from developing cerebral cortex. *Mol. Cell. Neurosci.* 21, 671–683.
- Van Haastert, P.J., Van Driel, R., Jastorff, B., Baraniak, J., Stec, W.J., De Wit, R.J., 1984. Competitive cAMP antagonists for cAMP-receptor proteins. *J. Biol. Chem.* 259, 10020–10024.
- Viti, J., Feathers, A., Phillips, J., Lillien, L., 2003. Epidermal growth factor receptors control competence to interpret leukemia inhibitory factor as an astrocyte inducer in developing cortex. *J. Neurosci.* 23, 3385–3393.
- Vossler, M.R., Yao, H., York, R., Pan, M.G., Rim, C.S., Stork, P.J.S., 1997. cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89, 73–82.
- Zwartkruis, F.J., Wolthuis, R.M., Nabben, N.M., Franke, B., Bos, J.L., 1998. Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signaling. *EMBO J.* 17, 5905–5912.

739

